

**EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN INSULIN (*Tithonia diversifolia*) TERHADAP  
KADAR SERUM KREATININ PADA TIKUS MODEL DIABETES MELITUS**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan**

**Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



**MUTIA KHAIRUNNISA SYA'BANI**

**NIM. 175070507111004**

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2021**

# HALAMAN PENGESAHAN

## TUGAS AKHIR

### EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN INSULIN (*Tithonia diversifolia*) TERHADAP KADAR SERUM KREATININ PADA TIKUS MODEL DIABETES MELITUS

Oleh:

Mutia Khairunnisa Sya'bani

NIM 175070507111004

Telah diuji pada

Hari : Rabu

Tanggal : 7 Juli 2021

dan telah dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I

Dr. apt. Valentina Yurnia, S.Si., M.Si.  
NIP. 198302092010122001

Pembimbing-I/Penguji-II

Pembimbing-II/Penguji-III

apt. Oktavia Rahayu A., S.Farm., M.Biomed.  
NIP/NIK. 2016099210192001

apt. Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm.  
NIK. 2011068512222001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,

apt. Aivan Febrian Shalas, M.Farm.  
NIP. 198502182019031007



**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Mutia Khairunnisa Sya'bani

NIM : 175070507111004

Program Studi : Program Studi Sarjana Farmasi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 22 Juni 2021

Yang membuat pernyataan,



(Mutia Khairunnisa Sya'bani)

NIM. 175070507111004

## KATA PENGANTAR

Segala puji kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini dengan judul "Efektivitas Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) Terhadap Kadar Serum Kreatinin pada Tikus Model Diabetes Melitus", sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Sarjana (S1) Jurusan Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini tidak dapat terselesaikan tanpa dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini terutama kepada:

1. Dr. dr. Wisnu Barlianto, Msi.Med., Sp.A(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan kepada penulis kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. apt. Alvan Febrian Shalas, S. Farm., M.Farm. selaku ketua Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membimbing penulis dalam menuntut ilmu di Program Studi Sarjana Farmasi di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. apt. Oktavia Rahayu Adianingsih, S.Farm., M.Biomed. sebagai dosen pembimbing-I yang dengan sabar membimbing dan memberi banyak masukan dan arahan selama penelitian hingga saat ini sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. apt. Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm. sebagai dosen pembimbing-II sekaligus dosen penasihat akademik yang dengan sabar membimbing dan meluangkan waktu untuk memberikan saran, evaluasi, dan semangat sehingga penyelesaian Tugas Akhir ini berjalan lancar.
5. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu melancarkan urusan administrasi, sehingga penulis dapat melaksanakan Tugas Akhir dengan lancar.



6. Kedua orang tua beserta adik penulis yang selalu mendoakan, memberikan motivasi dan pengorbanannya baik dari segi moril, materi kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
7. Teman-teman sepenelitian, Firda, Nabila, Laili, Weli, Kamila, Adiva, dan Christofer yang bersama-sama senantiasa telah memberikan semangat pantang menyerah dalam menyelesaikan penelitian di saat pandemi Covid-19.
8. Teman-teman seangkatan Jurusan Farmasi FKUB 2017, terutama kelas Farmasi B 2017, yang selalu memotivasi penulis hingga saat ini dan semoga hingga saat-saat yang akan datang, serta yang telah banyak membantu kelangsungan masa-masa perkuliahan penulis hingga menjadi kawan baik penulis selama di Malang.
9. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah membantu memberikan dukungan.

Penulis mohon maaf atas segala kesalahan yang pernah dilakukan. Semoga tugas akhir ini dapat memberikan manfaat untuk mendorong penelitian-penelitian selanjutnya.

Malang, 22 Juni 2021



Penulis

**ABSTRAK**

Sya'bani, Mutia K; 2021. **Efektivitas Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) Terhadap Kadar Serum Kreatinin pada Tikus Model Diabetes Melitus.**

Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) apt. Oktavia Rahayu Adianingsih, S.Farm., M.Biomed. (2) apt. Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm.

Hiperglikemia merupakan kondisi kadar glukosa dalam plasma darah melebihi batas normal yang merupakan tanda diabetes melitus. Kadar glukosa darah yang tidak terkontrol pada diabetes melitus dapat menyebabkan komplikasi berupa diabetes nefropati. Daun insulin (*Tithonia diversifolia*) memiliki kandungan flavonoid dan seskuiterpen yang mampu menurunkan kadar glukosa darah dan menangkap radikal bebas penyebab diabetes nefropati. Salah satu biomarker dari diabetes nefropati adalah kenaikan kadar serum kreatinin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun insulin terhadap kadar serum kreatinin pada tikus model diabetes melitus.

Penelitian ini menggunakan 36 ekor tikus Wistar jantan yang dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu KN (tidak diberi perlakuan), kelompok yang hanya diinduksi streptozotosin (STZ) 40 mg/kgBB di antaranya KP (tanpa diberi terapi), P1, P2, dan P3 yang masing-masing diberi ekstrak daun insulin 50, 100, dan 150 mg/kgBB, serta P4 (glikuidon 10 mg/kgBB). Penelitian ini dilakukan selama 42 hari. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan uji ANOVA atau *Kruskall Wallis* yang dilanjutkan dengan analisis lanjutan berupa uji *Tukey HSD* atau *Mann Whitney*.

Hasil penelitian menunjukkan kelompok terapi ekstrak daun insulin 100 dan 150 mg/kgBB serta glikuidon 10 mg/kgBB memiliki perbedaan lebih rendah yang signifikan ( $p < 0,05$ ) terhadap kelompok kontrol dan terapi ekstrak daun insulin 50 mg/kgBB. Namun, kadar serum kreatinin baik pada kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan masih termasuk dalam rentang normal.

**Kata kunci:** diabetes melitus, streptozotosin, ekstrak daun insulin, serum kreatinin



**ABSTRACT**

Sya'bani, Mutia K. 2021; **The Effectiveness of Insulin Leaf Extract on Serum Creatinine Levels in Diabetes Mellitus Model Rats**. Final Assignment, Pharmacy Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) apt. Oktavia Rahayu Adianingsih, S.Farm., M.Biomed. (2) apt. Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm.

Hyperglycemia is condition of glucose levels in blood plasma exceeding normal limits which is a sign of diabetes mellitus. Uncontrolled blood glucose levels in diabetes mellitus can cause complications such as diabetic nephropathy. Insulin leaves (*Tithonia diversifolia*) contain flavonoids and sesquiterpenes that can reduce blood glucose levels and capture free radicals that cause diabetic nephropathy. One of the biomarkers of diabetic nephropathy is an increase in serum creatinine levels. This study aims to determine the effect of insulin leaf extract on serum creatinine levels in diabetic mellitus rats.

This study used 36 male Wistar rats which were divided into 6 groups, namely KN (without treatment), then the group induced by streptozotocin (STZ) 40 mg/kgBW including KP (without therapy); P1, P2, and P3 were given insulin leaf extract 50, 100, and 150 mg/kgBW, respectively; and P4 (gliquidone 10 mg/kgBW). This research was conducted for 42 days. Data were obtained and analyzed using ANOVA or Kruskal Wallis test, followed by further analysis Tukey HSD or *Mann Whitney* test.

The results showed that the insulin leaf extract therapy group 100 and 150 mg/kgBW and gliquidone 10 mg/kgBW had a significantly lower difference ( $p < 0.05$ ) compared to the control group and the 50 mg/kgBW insulin leaf extract therapy group. However, serum creatinine levels in both the control and treatment groups were still in the normal range.

**Keywords:** diabetes mellitus, streptozotocin, insulin leaf extract, creatinine serum

DAFTAR ISI		Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....		i
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....		ii
KATA PENGANTAR.....		iii
ABSTRAK.....		v
ABSTRACT.....		vi
DAFTAR ISI.....		vii
DAFTAR TABEL.....		x
DAFTAR GAMBAR.....		xi
DAFTAR LAMPIRAN.....		xii
BAB 1 PENDAHULUAN.....		1
1.1	Latar Belakang Masalah.....	1
1.2	Rumusan Masalah.....	5
1.3	Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1	Tujuan Umum.....	5
1.3.2	Tujuan Khusus.....	5
1.4	Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1	Manfaat Akademik.....	6
1.4.2	Manfaat Praktis.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....		7
2.1	Daun Insulin ( <i>Tithonia diversifolia</i> ).....	7
2.1.1	Khasiat Umum.....	8
2.1.2	Aktivitas Antidiabetes Daun Insulin ( <i>Tithonia diversifolia</i> ).....	9
2.2	Diabetes Melitus (DM).....	10
2.2.1	Diagnosis Diabetes Melitus.....	11
2.2.2	Tipe-Tipe Diabetes Melitus.....	11
2.2.3	Komplikasi Diabetes Melitus.....	13
2.2.4	Nefropati Diabetik.....	13
2.3	Tata Laksana.....	15
2.3.1	Biguanida.....	15



2.3.2	Glitazon .....	16
2.3.3	Sulfonilurea .....	17
2.3.4	Penghambat $\alpha$ Glukosidase .....	18
2.4	Pengukuran Kadar Serum Kreatinin .....	18
2.4.1	<i>Jaffe Reaction</i> .....	20
2.4.2	Metode Kinetik .....	20
2.4.3	Metode Enzimatik .....	21
2.5	Streptozotosin (STZ) .....	22
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS .....		24
3.1	Kerangka Konsep .....	24
3.2	Hipotesis .....	26
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN .....		27
4.1	Rancangan Penelitian .....	27
4.2	Populasi dan Sampel .....	27
4.2.1	Sampel Penelitian .....	27
4.2.2	Kelompok Penelitian .....	28
4.3	Variabel Penelitian .....	29
4.3.1	Variabel Bebas .....	29
4.3.2	Variabel Terikat .....	29
4.3.3	Variabel Terkontrol .....	29
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian .....	30
4.5	Alat dan Bahan .....	30
4.5.1	Preparasi Ekstrak .....	30
4.5.2	Persiapan Hewan Coba .....	31
4.5.3	Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus .....	31
4.5.4	Pemberian Terapi .....	31
4.5.5	Pengukuran Serum Kreatinin .....	31
4.6	Definisi Operasional .....	32
4.7	Alur Penelitian .....	33
4.8	Prosedur Penelitian .....	34
4.8.1	Preparasi Ekstrak .....	34
4.8.2	Persiapan Hewan Coba .....	35



4.8.3	Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus .....	36
4.8.4	Pemberian Terapi .....	37
4.8.5	Pengambilan Sampel dan Pengukuran Serum Kreatinin .....	38
4.9	Analisis Data .....	39
BAB 5 HASIL .....		41
5.1	Hasil Ekstraksi .....	41
5.2	Hasil Pengukuran Kadar Serum Kreatinin .....	41
5.3	Analisis Data .....	43
BAB 6 PEMBAHASAN .....		46
6.1	Pembahasan Hasil Penelitian .....	46
6.2	Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian .....	52
6.3	Keterbatasan Penelitian .....	52
BAB 7 PENUTUP .....		54
7.1	Kesimpulan .....	54
7.2	Saran .....	54
DAFTAR PUSTAKA .....		55
LAMPIRAN .....		60



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel 4. 1</b> Kelompok, Jumlah, dan Perlakuan Sampel Penelitian .....	28
<b>Tabel 4. 2</b> Komposisi Reagen.....	39
<b>Tabel 5. 1</b> Hasil Ekstraksi Daun Insulin .....	41
<b>Tabel 5. 2</b> Rata-Rata Kadar Serum Kreatinin Setelah H42 Terapi.....	42
<b>Tabel 5. 3</b> Hasil Analisa Data Kadar Serum Kreatinin.....	44
<b>Tabel 6. 1</b> Hasil penelitian rata-rata kadar serum kreatinin pada kelompok kontrol normal dan kelompok diabetik yang diinduksi streptozotosin dengan berbagai dosis .....	47

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar 2. 1</b> <i>Tithonia diversifolia</i> .....	8
<b>Gambar 2. 2</b> Senyawa Ftokimia pada <i>Tithonia diversifolia</i> .....	10
<b>Gambar 2. 3</b> Reaksi Enzimatik Serum Kreatinin .....	21
<b>Gambar 3. 1</b> Kerangka Konsep .....	24
<b>Gambar 4. 1</b> Alur Penelitian .....	33





## DAFTAR LAMPIRAN

<b>Lampiran 1</b> Keterangan Kelaikan Etik .....	60
<b>Lampiran 2</b> Surat Determinasi Tanaman Paitan .....	61
<b>Lampiran 3</b> Preparasi Terapi (Ekstrak dan Glikuidon) .....	62
<b>Lampiran 4</b> Pembuatan Buffer Sitrat .....	63
<b>Lampiran 5</b> Perhitungan Dosis Streptozotosin (STZ) .....	64
<b>Lampiran 6</b> Hasil Pemeriksaan Serum Kreatinin (Lab Patologi Klinik FKUB) .....	65
<b>Lampiran 7</b> Analisa Data Kadar Serum Kreatinin (SPSS) .....	66
<b>Lampiran 8</b> Dokumentasi Penelitian .....	72

## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Diabetes melitus (DM) adalah sekelompok gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan kelainan pada metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein (Dipiro *et al.*, 2015). Penyakit ini merupakan penyakit tidak menular yang memberikan kontribusi pada morbiditas, mortalitas dan kualitas hidup yang buruk. (Kumar *et al.*, 2016). Manifestasi klinis dari gangguan ini adalah hiperglikemia. Hiperglikemia ini dihubungkan dengan ketidaknormalan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein dan menyebabkan komplikasi-komplikasi, termasuk mikrovaskular, makrovaskular, dan gangguan neuropati (Dipiro *et al.*, 2015).

Menurut World Health Organization (WHO), sekitar 150 juta orang menderita diabetes melitus di seluruh dunia dan dapat menjadi dua kali lipat pada tahun 2025. Sebagian besar peningkatan ini akan terjadi di negara berkembang.

Diabetes adalah penyebab utama kebutaan, gagal ginjal, serangan jantung, stroke dan amputasi tungkai bawah. Indonesia adalah salah satu dari 10 negara dengan jumlah penderita diabetes terbesar (Mihardja *et al.*, 2014). Berdasarkan data *International Diabetes Federation* (IDF) tahun 2015 terdapat 10 juta kasus diabetes yang terjadi di Indonesia. Sementara itu, data Riskesdas 2013 yang diolah oleh Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI mencatat bahwa dari 28.855.895 orang dengan usia > 14 tahun di Provinsi Jawa Timur, terdapat sebanyak 605.974 penduduk yang pernah didiagnosis menderita diabetes oleh dokter dan 115.424 penduduk yang



belum pernah didiagnosis menderita diabetes oleh dokter tetapi dalam 1 bulan terakhir mengalami gejala sering lapar, sering haus, sering buang air kecil dalam jumlah banyak dan berat badan menurun.

Hiperglikemia yang terjadi pada DM memiliki efek jangka panjang yaitu kerusakan, disfungsi, dan kegagalan pada berbagai organ, terutama pada mata, ginjal, saraf, dan jantung (Dabla, 2010). Efek jangka panjang DM salah satunya adalah komplikasi mikrovaskular. Komplikasi mikrovaskular yang umum terjadi adalah retinopati diabetik dan nefropati diabetik (Putri, 2015). Komplikasi di ginjal tersebut dapat terjadi pada diabetes melitus tipe 1 maupun tipe 2, 20% pasien setelah mengalami diabetes selama 10-20 tahun dapat mengembangkan nefropati diabetik (Vallon dan Thomson, 2012). Nefropati diabetik berkembang bahkan pada pasien diabetes melitus yang mengalami kadar glukosa darah yang terkontrol dalam waktu yang lama (Rini *et al.*, 2018).

Nefropati diabetik (ND) merupakan komplikasi mikrovaskular penyakit diabetes melitus yang terjadi pada pembuluh darah halus (kecil). Nefropati diabetik adalah salah satu penyebab utama gagal ginjal dan kematian tertinggi diantara semua komplikasi diabetes melitus (Hendromartono, 2009). Nefropati diabetik adalah salah satu komplikasi paling serius dari diabetes melitus dan telah menjadi penyebab utama terjadinya *end-stage renal disease* (ESRD). Stadium lanjut dari ND juga akan menghasilkan gangguan pada sistem kardiovaskular sehingga dapat meningkatkan angka kematian akibat gangguan pada ginjal dan sistem kardiovaskular (Reutens, 2013). Prevalensi diabetes melitus diperkirakan akan meningkat hingga 21,3 juta jiwa (Subroto, 2006). Prevalensi ini akan terus meningkat di seluruh dunia dari 6% menjadi



10%, karena banyak ditemukannya kasus-kasus baru pada penyakit ini. Karena itu kenaikan angka morbiditas maupun mortalitas semakin meningkat dari waktu ke waktu (Lee *et al.*, 2003). Nefropati diabetik ditandai dengan adanya mikroalbuminuria (30 mg/hari atau 20 µg/menit) tanpa adanya gangguan ginjal, disertai dengan peningkatan tekanan darah sehingga menyebabkan menurunnya filtrasi glomerulus dan akhirnya mengakibatkan gagal ginjal tahap akhir. Nefropati diabetik merupakan penyakit yang didasari oleh perubahan yang bersifat patologis seperti penebalan membran basal, atrofi, fibrosis interstisial dan arteriosklerosis. Perubahan patologis tersebut akan menghasilkan hiperfiltrasi glomerulus dan kemudian ginjal akan mengalami penurunan fungsi secara progresif (Thomas *et al.*, 2015).

Indikator yang digunakan untuk menilai fungsi ginjal salah satunya adalah serum kreatinin (Isniaty, 2007). Selama beberapa tahun terakhir, serum kreatinin telah menjadi penanda atau *biomarker* untuk mengetahui fungsi ginjal. Kreatinin merupakan parameter yang dapat merepresentasikan fungsi ginjal dengan baik karena tidak dipengaruhi oleh diet/asupan. Pemeriksaan kadar kreatinin serum juga membantu dokter untuk menentukan apakah gangguan fungsi ginjal yang dialami oleh pasien memerlukan tindakan hemodialisa atau tidak. Disfungsi ginjal yang terjadi pada nefropati diabetik akibat hiperglikemia akan menyebabkan kemampuan filtrasi kreatinin di ginjal menurun sehingga menghasilkan peningkatan kadar kreatinin pada serum. Peningkatan kadar serum kreatinin sebesar dua kali lipat dapat mengindikasikan adanya penurunan fungsi ginjal sebesar 50% (Alfonso *et al.*, 2016).

Obat anti hiperglikemia yang telah tersedia saat ini bertujuan untuk mengurangi komplikasi mikrovaskular dan neuropati jangka panjang yang diakibatkan



oleh diabetes (Nathan, 2009). Salah satu tumbuhan yang memiliki aktivitas antihiperglikemia adalah daun dari tumbuhan kembang bulan atau *Tithonia diversifolia* (Sasmita, 2017). Di Indonesia, *Tithonia diversifolia* dikenal juga dengan nama kembang bulan. Masyarakat Indonesia telah banyak menggunakan daun kembang bulan sebagai anti-hiperglikemik (Fauziyah *et al.*, 2018). *Tithonia diversifolia* juga telah digunakan oleh masyarakat China sebagai pengobatan anti diabetes dengan menggunakan lima lembar daun *Tithonia diversifolia* (Sasmita, 2017). Daun kembang bulan digunakan sebagai obat anti diabetes karena memiliki kandungan berupa senyawa alkaloid, terpenoid, saponin, tanin dan polifenol (Amanatie, 2015). Flavonoid yang terdapat pada daun kembang bulan merupakan antioksidan yang bersifat protektif terhadap kerusakan di sel  $\beta$  pankreas sehingga akan menghasilkan peningkatan sensitivitas insulin dengan hasil akhir menurunkan konsentrasi glukosa darah. Flavonoid terutama *quercetin* juga memiliki fungsi menghambat *Glucose Transporters 2* (GLUT 2) di mukosa usus sehingga dapat menurunkan absorpsi glukosa. Penurunan absorpsi glukosa tersebut akan menurunkan penyerapan glukosa dan fruktosa dari usus sehingga akan menghasilkan penurunan glukosa darah (Ajie, 2015).

Pembahasan di atas memberikan alasan peneliti bahwa senyawa yang terdapat dalam daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dapat digunakan sebagai obat anti hiperglikemia pada penderita DM sehingga akan mencegah dan mengurangi resiko terjadinya komplikasi mikrovaskular berupa nefropati diabetik dan dapat menghasilkan kadar kreatinin serum yang normal. Penelitian ini juga diharapkan dapat mendukung data ilmiah terkait penggunaan daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dalam

pengobatan diabetes sehingga selanjutnya daun insulin dapat menjadi pengobatan alternatif untuk diabetes dengan kualitas farmasetik dan klinis yang baik, harga yang terjangkau dan tersedia untuk masyarakat Indonesia.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, dapat dirumuskan permasalahan yaitu apakah ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dapat menurunkan kadar serum kreatinin pada tikus model diabetes melitus?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dalam penurunan kadar serum kreatinin pada tikus model diabetes melitus.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Adapun tujuan khusus dari penelitian ini adalah:

1. Untuk mengukur kadar serum kreatinin pada tikus model diabetes melitus setelah diberikan ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*).
2. Untuk mengetahui dosis ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang paling efektif dalam menurunkan kadar serum kreatinin.



## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademik

Mampu mendukung penelitian unggulan Universitas Brawijaya bidang Kesehatan, gizi, dan obat-obatan dengan target tersedianya formulasi obat herbal terstandar pada tahun 2020-2025.

### 1.4.2 Manfaat Praktis

Mampu menjadi penelitian yang mendukung mengenai efektivitas daun insulin (*Tithonia diversifolia*) terhadap penurunan kadar serum kreatinin.



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray disebut juga sebagai bunga matahari Meksiko (Miranda *et al.*, 2015). Daun Insulin merupakan tanaman semak yang awalnya diperkenalkan dari Amerika Tengah ke Kenya sebagai tanaman hias.

Tanaman ini umumnya tumbuh di daerah dengan ketinggian 550-1950 meter, dengan rata-rata suhu tahunan sekitar 15-31°C, dan dengan curah hujan tahunan rata-rata antara 100-2000 mm. Tanaman asli Meksiko ini juga tumbuh di beberapa bagian Afrika, Australia, Asia, dan negara negara lain di Amerika Utara (Di Giacomo *et al.*, 2015). *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray memiliki berbagai nama di Indonesia seperti "Daun Paitan", "Kembang Bulan", "Rondo Noleh", "Rondo Semoyo", "Kirinyu" di Sunda, dan "Kayu Paik" di Minang. Masyarakat Indonesia telah banyak menggunakan daun kembang bulan sebagai anti hiperglikemik (Fauziyah *et al.*, 2018).

Taksonomi tumbuhan Kembang adalah sebagai berikut (Amanatie dan Sulistyowati, 2015)

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae

Ordo : Asterales

Famili : Asteraceae

Genus : *Tithonia*



Spesies : *Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray

*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray adalah tumbuhan yang dikenal juga sebagai tumbuhan insulin. Tumbuhan ini dapat mencapai tinggi sampai dengan 9 meter, bertunas dan dapat juga merayap di dalam tanah. Tumbuhan ini secara umum tumbuh liar di tempat-tempat yang curam seperti di tebing-tebing, di tepi-tepi sungai, dan di selokan. Kembang bulan biasanya dimanfaatkan pada bagian daunnya (Amanatie, 2015). Gambar tumbuhan *Tithonia diversifolia* atau kembang bulan ditunjukkan seperti pada **Gambar 2.1**.



**Gambar 2. 1** *Tithonia diversifolia* (Amanatie, 2015).

### **2.1.1 Khasiat Umum**

*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray dan ekstraknya sudah digunakan secara tradisional untuk pengobatan diabetes, diare, nyeri haid, malaria, hematoma, hepatitis, hepatoma, dan untuk penyembuhan luka. Penggunaan tanaman daun kembang bulan sebagai pengobatan tradisional telah diteliti disebabkan oleh efek dari kandungan terpenoid dan flavonoid yang dimilikinya. Terpenoid dan flavonoid merupakan antioksidan yang dapat mencegah pembentukan radikal bebas,



menetralkan radikal bebas dengan mekanisme non enzimatis atau dengan cara meningkatkan aktivitas antioksidan endogen. Senyawa polifenol yang terdapat di *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray telah diteliti memiliki pengaruh dalam menginduksi ekspresi kuat dari HO-1 (Heme Oxygenase - 1) dengan memberikan efek perlindungan. Penurunan aktivitas antioksidan telah dikaitkan dengan peningkatan pembentukan radikal bebas. Radikal bebas dapat menyebabkan peningkatan proliferasi dan diferensiasi dari sel adiposit sehingga dapat menyebabkan terjadinya obesitas (Di Giacomo *et al.*, 2015).

### 2.1.2 Aktivitas Antidiabetes Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

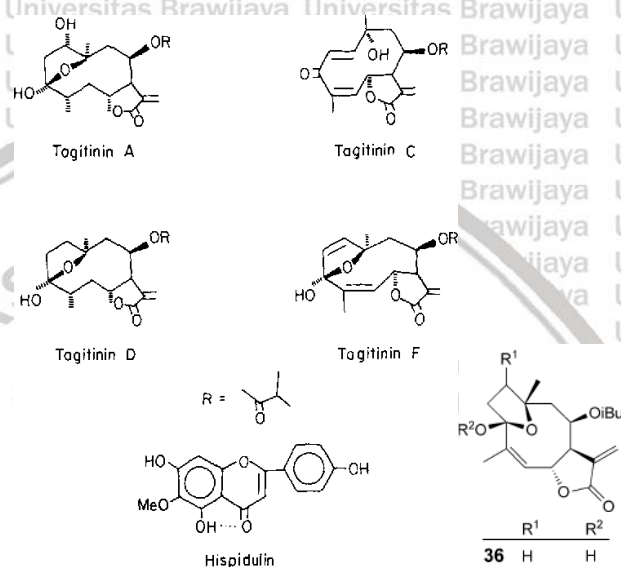
Daun *Tithonia diversifolia* digunakan sebagai obat antidiabetes karena memiliki kandungan berupa senyawa tanin, saponin, dan flavonoid (Amanatie, 2015).

Daun insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) memiliki berbagai kandungan yang berperan dalam melawan radikal bebas, menginduksi sistem pertahanan stress selular serta kandungan tanin, flavonoid dan saponin yang banyak berpotensi dalam bidang farmakologi (Ejelonu *et al.*, 2017). Mekanisme kerja saponin yaitu dengan menghambat GLUT-1 sehingga menurunkan absorpsi glukosa (Blasiak *et al.*, 2003).

Flavonoid pada DM dapat menghindari absorpsi gula, menstimulasi pengambilan glukosa pada jaringan perifer, juga dapat bertindak seperti insulin dengan cara mempengaruhi mekanisme pensinyalan insulin (Geetha *et al.*, 2010). Tanin dapat memicu metabolisme glukosa dan lemak sehingga timbunan dari kedua sumber kalori ini dapat dihindari. Tanin juga memiliki aktivitas hipoglikemik dengan meningkatkan glikogenesis (Dalimartha, 2005). Selain itu, senyawa fitokimia yang terkandung pada *Tithonia diversifolia* antara lain *sesquiterpene lactone* (tagitinin A, C, F; tirotundin;



tithonine), *chlorogenic acid* (CA, 5-caffeoylquinic acid), flavon (hispidulin/6-metoksiapigenin), hispidulin, dan diversifolin (Chagas-Paula *et al.*, 2011). Struktur senyawa fitokimia pada *Tithonia diversifolia* ditunjukkan pada **Gambar 2.2**.



**Gambar 2. 2** Senyawa Fitokimia pada *Tithonia diversifolia* (Chagas-Paula *et al.*, 2011).

## 2.2 Diabetes Melitus (DM)

Diabetes melitus (DM) merupakan suatu kelompok penyakit metabolik yang ditandai dengan hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin atau kedua-duanya. Diabetes melitus (DM) adalah sekelompok gangguan metabolisme yang ditandai dengan hiperglikemia dan kelainan pada metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein (Dipiro *et al.*, 2015). Penyakit ini merupakan penyakit tidak menular yang memberikan kontribusi pada morbiditas, mortalitas dan kualitas hidup yang buruk. (Kumar *et al.*, 2016). Manifestasi klinis dari gangguan ini adalah hiperglikemia. Hiperglikemia ini dihubungkan dengan ketidaknormalan metabolisme

karbohidrat, lemak dan protein dan menyebabkan komplikasi-komplikasi, termasuk mikrovaskular, makrovaskular, dan gangguan neuropati (Dipiro *et al.*, 2008).

### 2.2.1 Diagnosis Diabetes Melitus

Diagnosis diabetes melitus (DM) terdiri dari empat kriteria, yaitu (Dipiro *et al.*, 2015):

- 1) Hemoglobin A1C (HbA1C)  $\geq 6,5\%$  ( $\geq 0,065$ ;  $\geq 48$  mmol/mol Hb)
- 2) Glukosa darah puasa (GDP)  $\geq 126$  mg/dL ( $\geq 7$  mmol/L)
- 3) Glukosa darah 2 jam dari 75 g *oral glucose tolerance test* (OGTT)  $\geq 200$  mg/dL ( $\geq 11,1$  mmol/L)
- 4) Glukosa darah acak (GDA)  $\geq 200$  mg/dL ( $\geq 11$  mmol/L) dengan gejala hiperglikemia

### 2.2.2 Tipe-Tipe Diabetes Melitus

#### 1. Diabetes Melitus Tipe 1 (DM Tipe 1)

Diabetes melitus tipe 1, sebelumnya dikenal dengan *insulin-dependent* atau *childhood-onset diabetic*, merupakan kelainan sistemik akibat terjadinya gangguan metabolisme glukosa yang ditandai oleh hiperglikemia kronik.

Keadaan ini disebabkan oleh kerusakan sel  $\beta$  pankreas baik oleh proses autoimun maupun idiopatik sehingga produksi insulin berkurang bahkan terhenti. Tubuh tidak mampu menghasilkan insulin. Sekresi insulin yang rendah mengakibatkan gangguan pada metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein. Tanda dan gejala dari DM tipe 1 ini antara lain poliuria, polidipsia, nokturia, enuresis, penurunan berat badan yang cepat, kadang-kadang disertai polifagia dan gangguan penglihatan (PERKENI, 2015).



## 2. Diabetes Melitus Tipe 2 (DM Tipe 2)

Diabetes melitus tipe 2 (DM tipe 2) merupakan kasus diabetes yang paling banyak dijumpai. DM tipe 2 ditandai dengan adanya gangguan sekresi insulin ataupun gangguan kerja insulin (resistensi insulin) pada organ target terutama hati dan otot (Hendromartono, 2009). Pada diabetes melitus tipe ini, pasien tidak mengalami kerusakan pada sel-sel  $\beta$  pankreas sehingga jumlah insulin normal. Namun jumlah reseptor insulin yang terdapat pada permukaan sel sedikit sehingga glukosa yang masuk ke sel sedikit, maka glukosa dalam darah menjadi meningkat (Amanitie dan Sulistyowati, 2015). Resistensi insulin pada otot dan hati serta kegagalan sel  $\beta$  pankreas telah dikenal sebagai patofisiologi kerusakan sentral dari DM tipe 2. Belakangan diketahui bahwa kegagalan sel beta terjadi lebih dini dan lebih berat daripada yang diperkirakan sebelumnya. Selain otot, hati dan sel  $\beta$ , organ lain seperti: jaringan lemak (meningkatnya lipolisis), gastrointestinal (defisiensi incretin), sel  $\alpha$  pankreas (hiperglukagonemia), ginjal (peningkatan absorpsi glukosa), dan otak (resistensi insulin), kesemuanya ikut berperan dalam menimbulkan terjadinya gangguan toleransi glukosa pada DM tipe 2 (PERKENI, 2015). Umumnya pasien DM tipe 2 juga disertai kegemukan dan cenderung mengalami mikrovaskular dan makrovaskular (Amanitie dan Sulistyowati, 2015).

## 3. Diabetes Melitus Gestasional (DMG)

Diabetes melitus gestasional (DMG) merupakan diabetes yang timbul selama masa kehamilan. Diabetes tipe ini meliputi 2-5% dari seluruh diabetes. Deteksi klinis penting agar terapi dapat dilakukan sehingga cacat dan kematian

perinatal dapat diturunkan. Selama kehamilan, diabetes gestasional memerlukan terapi untuk menormalkan kadar glukosa darah ibu untuk mencegah komplikasi pada janin (Hendromartono, 2009).

#### 4. Diabetes Melitus Tipe Lainnya

Pada diabetes melitus tipe ini disebabkan oleh berbagai kelainan genetik yang spesifik (kerusakan genetik sel  $\beta$  pankreas dan kerja insulin), penyakit pada pankreas, obat-obatan, infeksi, dan lain-lain (Amanitie, 2015).

#### 2.2.3 Komplikasi Diabetes Melitus

Komplikasi makrovaskular secara umum memiliki gejala klinik berupa penyakit jantung iskemik, stroke dan kelainan pembuluh darah perifer. Komplikasi mikrovaskular yang secara umum terjadi seperti retinopati diabetik, neuropati diabetik, dan nefropati diabetik.

#### 2.2.4 Nefropati Diabetik

Nefropati diabetik merupakan komplikasi yang berhubungan dengan ginjal akibat dari DM tipe 1 dan DM tipe 2. Nefropati diabetik juga sering disebut sebagai *diabetic kidney disease* (DKD) (Putri, 2015). ND merupakan salah satu komplikasi mikrovaskular penyakit diabetes melitus yang terjadi pada pembuluh darah halus (kecil). Definisi dari ND adalah perubahan struktur dan fungsi dari ginjal. Perubahan struktural ginjal yang utama terjadi pada DKD meliputi ekspansi mesangial, sklerosis glomerulus dan penebalan membran basal dan tubular glomerulus. Manifestasi yang dapat terjadi pada ND adalah albuminuria persisten ( $> 300$  mg/hari), peningkatan tekanan darah, dan penurunan berkelanjutan dari *glomerular filtration rate* (GFR) (Dabla, 2010). Penyebab utama terjadinya ND adalah efek jangka



panjang dari hiperglikemia yang tidak terkontrol. Glukosa yang tinggi dalam darah akan bereaksi dengan protein sehingga mengubah struktur dan fungsi sel, termasuk membran basal glomerulus. Akibatnya, penghalang protein rusak dan terjadi kebocoran protein ke urin (albuminuria). Hal ini berpengaruh buruk pada ginjal. Pada pasien dengan diabetes melitus dapat mengalami proteinuria dengan persentase sekitar 15-40% untuk penderita DM tipe 1 dan sekitar 5-20% untuk penderita DM tipe 2 (Chawla *et al.*, 2016).

Nefropati diabetik (ND) merupakan hasil dari tiga mekanisme yaitu perubahan hemodinamik ginjal, iskemia dan abnormalitas metabolisme glukosa yang menyebabkan peningkatan dari stres oksidatif, dan proses inflamasi dan peningkatan aktivitas *renin angiotensin aldosterone system* (RAAS). Perubahan hemodinamik ginjal disebabkan oleh terjadinya hiperfiltrasi glomerulus yang menyebabkan terjadinya ND. Hiperglikemia pada diabetes melitus akan menyebabkan pelepasan mediator vasoaktif seperti *insulin like growth factor 1* (IGF 1), glukagon, *nitric oxide* (NO), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) dan prostaglandin. Mediator vasoaktif yang terlepas tersebut akan menyebabkan dilatasi dari arteriol aferen. Fungsi tubulus ginjal juga mengalami perubahan akibat tingkat kontrol glikemik yang dilakukan oleh tubuh. Hiperglikemia akan menyebabkan tubulus meningkatkan filtrasi glukosa, reabsorpsi glukosa dan natrium klorida (NaCl). Peningkatan ini akan menyebabkan up-regulasi dari *sodium glucose cotransporter 2* (SGLT2) di dalam tubulus proksimal, sehingga kadar NaCl di makula densa menurun, kemudian akan mengakibatkan dilatasi arteriol aferen karena umpan balik dari tubuloglomerular. Konstriksi arteriol eferen akan terjadi juga pada saat yang sama karena peningkatan dari angiotensin II



(AT-II). Dilatasi arteriol aferen dan kontriksi arteriol eferen akan menghasilkan perubahan autoregulasi dan hipertensi glomerulus. Hiperinsulinemia juga dapat meningkatkan *endothelin* 1 (ET-1) yang akan menghasilkan vasokonstriksi dan disfungsi pembuluh darah. Aktivasi reseptor *endothelin* pada ginjal terkait juga dengan kerusakan podosit, stres oksidatif, dan inflamasi. Hiperglikemia juga akan menyebabkan kelebihan mitokondria yang akan menyebabkan peningkatan produksi *reactive oxygen species* (ROS). ROS akan mengaktifasi TGF  $\beta$  melalui pembentukan *advanced glycation end-product* (AGEs). ROS yang berikatan dengan reseptor AGEs akan memicu factor-factor transkripsi seperti NF $\kappa$ B yang memicu peningkatan sitokin. Produksi ROS yang meningkat juga akan mengakibatkan kerusakan podosit glomerulus dan meningkatkan apoptosis podosit glomerulus (Lin *et al.*, 2018).

## 2.3 Tata Laksana

### 2.3.1 Biguanida

Golongan biguanida yang paling banyak digunakan saat ini adalah metformin. Metformin menurunkan glukosa darah melalui pengaruhnya terhadap kerja insulin pada tingkat selular, distal reseptor insulin, dan menurunkan produksi glukosa darah. Metformin meningkatkan pemakaian glukosa oleh sel usus sehingga menurunkan glukosa darah. Metformin juga dapat menstimulasi produksi *glucagon like peptide-1* (GLP-1) dari gastrointestinal yang dapat menekan fungsi sel  $\alpha$  pankreas sehingga menurunkan glukagon serum dan mengurangi hiperglikemia saat puasa. Metformin tidak memiliki efek stimulasi pada sel  $\beta$  pankreas sehingga tidak mengakibatkan hipoglikemia dan peningkatan berat badan. Efek samping gestasional



sering ditemukan pada awal pemakaian metformin namun resiko efek samping ini dapat dikurangi dengan cara memulai obat dengan dosis rendah dan diberikan bersama dengan makanan. Efek samping lainnya yang dapat terjadi yaitu asidosis laktat. Meskipun efek samping ini jarang sekali terjadi namun dapat berakibat fatal pada 30-50% kasus. Pada kasus gangguan ginjal berat, metformin dosis tinggi akan terakumulasi dalam mitokondria dan menghambat proses fosforilasi oksidatif sehingga mengakibatkan asidosis laktat. Untuk menghindari hal tersebut, metformin sebaiknya tidak diberikan pada pasien dengan gangguan fungsi ginjal (kreatinin > 1,3 mg/dL pada perempuan dan > 1,5 mg/dL pada laki-laki). Metformin juga dikontraindikasikan untuk pasien dengan gangguan fungsi hati, infeksi berat, pengguna alkohol berlebihan, dan pasien gagal jantung yang memerlukan terapi. Selain itu, penggunaan metformin perlu dilakukan pemantauan ketat pada pasien lanjut usia (> 80 tahun) (Hendromartono, 2009).

### 2.3.2 Glitazon

Obat yang termasuk golongan glitazon antara lain rosiglitazon dan pioglitazon. Glitazon (*Thiazolidines*) merupakan agonist peroxisome *proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ). Reseptor PPAR $\gamma$  terdapat di jaringan target kerja insulin seperti jaringan adiposa, otot skeletal, dan hati. Sama seperti metformin, glitazon tidak menstimulasi produksi insulin oleh sel  $\beta$  pankreas. Glitazon dapat meningkatkan efisiensi dan respon sel  $\beta$  pankreas dengan menurunkan glukotoksisitas dan foto toksisitas. Glitazon dapat merangsang ekspresi beberapa protein yang dapat memperbaiki sensitifitas insulin dan memperbaiki glikemia, Selain itu juga dapat mempengaruhi resi ekspresi dan pelepasan mediator resistensi insulin



seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF)  $\alpha$  dan leptin. Glitazon memiliki efek samping yaitu penambahan berat badan dan edema. Penggunaan glitazon dihentikan jika terdapat kenaikan enzim hati ALT dan AST lebih dari 3 kali batas atas normal sehingga penggunaannya hati-hati pada pasien dengan riwayat penyakit hati sebelumnya (Hendromoto, 2009).

### 2.3.3 Sulfonilurea

Obat yang termasuk golongan sulfonilurea antara lain glibenklamid, glimepirid, glikuidon, klorpropamid, gliklazid, dan glipizid. Sulfonilurea bekerja dengan merangsang sel  $\beta$  pankreas untuk melepaskan insulin yang masih tersimpan, sehingga lebih bermanfaat digunakan pada pasien yang masih mampu mensekresi insulin. Sulfonilurea merangsang *channel* K yang tergantung pada ATP dari sel  $\beta$  pankreas jika sulfonilurea terikat pada reseptor (SUR) *channel* tersebut maka akan terjadi penutupan. Keadaan ini akan menyebabkan terjadinya penurunan permeabilitas K pada membran sel  $\beta$ , polarisasi membran dan membuka *channel* Ca tergantung voltase dan menyebabkan peningkatan Ca intrasel. Ion Ca akan terikat pada calmodulin, sehingga terjadi eksositosis granul yang mengandung insulin. Efek samping utama dari sulfonilurea adalah hipoglikemia jika asupan pasien tidak adekuat. Sulfonilurea dengan masa kerja panjang sebaiknya tidak digunakan pada pasien lanjut usia karena dapat menyebabkan hipoglikemia. Selain itu hipoglikemia juga lebih sering terjadi pada pasien dengan gangguan ginjal, gangguan fungsi hati berat, pasien dengan masukan makanan yang kurang, dan jika dipakai bersama dengan obat sulfa. Selain hipoglikemia, sulfonilurea juga dapat menyebabkan kenaikan berat badan sekitar 4-6 kg, gangguan pencernaan, fotosensitivitas,



gangguan enzim hati, dan *flushing*. Sulfonilurea dikontraindikasikan pada pasien DM tipe 1, hipersensitifitas terhadap sulfa, hamil, dan menyusui (Hendromartono, 2009).

#### 2.3.4 Penghambat $\alpha$ Glukosidase

Obat antidiabetes yang termasuk golongan penghambat  $\alpha$  glukosidase adalah *acarbose*. *Acarbose* bekerja secara kompetitif menghambat kerja enzim glukosidase di dalam saluran cerna sehingga menurunkan penyerapan glukosa dan menurunkan hiperglikemia *postprandial*. Obat ini bekerja di lumen usus dan tidak menyebabkan hipoglikemia dan juga tidak berpengaruh pada kadar insulin. Efek samping dari *acarbose* ini adalah gejala gastrointestinal seperti *flatulence* dan diare. *Flatulence* merupakan efek yang paling sering terjadi pada hampir 50% pengguna *acarbose*. *Acarbose* dikontraindikasikan pada kondisi irritable bowel syndrome, obstruksi saluran cerna, sirosis hati, dan gangguan fungsi ginjal (Hendromartono, 2009).

#### 2.4 Pengukuran Kadar Serum Kreatinin

Ginjal merupakan organ vital yang berfungsi penting untuk tubuh. Pemeriksaan laboratorium yang bertujuan untuk mengevaluasi dan mengidentifikasi fungsi ginjal pada pasien diabetes melitus akan membantu proses pengobatan pada pasien. Salah satu pemeriksaan fungsi ginjal yang paling umum dan murah adalah pemeriksaan kadar serum kreatinin (Bjornstad *et al.*, 2015).

Kreatinin merupakan hasil metabolisme dari kreatin dan fosfokreatin. Kreatinin memiliki berat molekul sebesar 113-Da (Dalton) (Alfonso *et al.*, 2016). Kreatinin dalam urin berasal dari filtrasi glomerulus dan sekresi oleh tubulus proksimal



ginjal. Berat molekulnya kecil sehingga dapat secara bebas masuk dalam filtrat glomerulus (Levey, 2003; Remer *et al.* 2002; Henry, 2001). Kreatin disintesis di hati dan terdapat pada hampir semua otot rangka. Kreatinin merupakan hasil metabolisme endogen dari otot skeletal yang diekskresikan melalui filtrasi glomerulus yang akan dibuang melalui urine dan tidak direabsorpsi atau disekresikan oleh tubulus ginjal.

Dalam jumlah kecil kreatinin disekresikan oleh tubulus, sehingga jumlah kreatinin yang diekskresikan dalam urin sedikit melebihi jumlah yang difiltrasi. Tinggi rendahnya kadar kreatinin dalam darah digunakan sebagai indikator penting dalam menentukan apakah seorang mengalami gangguan fungsi ginjal (Alfonso *et al.*, 2016) sehingga pemeriksaan kreatinin serum dapat berfungsi sebagai indikator perjalanan penyakit nefropati diabetik yang berpotensi mengalami gagal ginjal dan sebagai kontrol fungsi ginjal pada penderita DM yang sudah mengalami komplikasi gagal ginjal (Rahman, 2008). Hasil pemeriksaan serum kreatinin biasanya digunakan untuk menghitung laju filtrasi glomerulus atau *Glomerulus Filtration Rate* (GFR) (Handajani dan Dharmawan, 2009). Kadar kreatinin berada dalam keadaan relatif konstan, sehingga menjadikannya sebagai penanda filtrasi ginjal yang baik (Verdiansyah, 2016). Peningkatan kadar kreatinin dalam darah dapat disebabkan adanya kerusakan ginjal terutama karena gangguan filtrasi glomerulus, nekrosis tubulus akut, glomerulonefritis (kerusakan pada glomerulus) (Stevens dan Levey, 2004), dan apoptosis tubulus (Baek *et al.*, 2003). Kadar kreatinin normal adalah 0,8 sampai 1,4 mg/dL, secara umum kadar kreatinin pada wanita lebih rendah yaitu sekitar 0,6 sampai 1,2 mg/dL. Perbedaan tingkat kadar kreatinin pada wanita dan laki-laki tersebut disebabkan oleh massa otot yang lebih sedikit pada wanita (Dabla, 2010).



Pengukuran kadar serum kreatinin dapat dilakukan melalui 3 metode, yaitu:

#### **2.4.1 Jaffe Reaction**

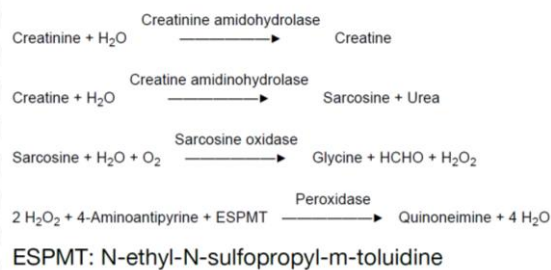
Metode yang digunakan untuk pemeriksaan kreatinin darah adalah metode Jaffe. Metode Jaffe dikenal juga dengan metode alkalin pikrat. Pada pemeriksaan kreatinin dengan metode ini memiliki prinsip pemeriksaan yaitu reaksi antara kreatinin dalam suasana alkalis dengan asam pikrat akan membentuk kompleks senyawa berwarna kuning jingga. Alat yang digunakan adalah photometer (Winarni, 2010). Keunggulan metode Jaffe adalah murah, cepat, dan jumlah sampel yang dibutuhkan sedikit. Namun, pada metode Jaffe ini berbagai kromogen selain kreatinin dapat mengganggu pemeriksaan seperti keton, glukosa, fruktosa, urea, protein, dan asam askorbat dapat bereaksi dengan pikrat sehingga menyebabkan peningkatan kadar kreatinin palsu. Tanpa menghilangkan kromogen non-kreatinin nilai normal kreatinin dengan metode Jaffe adalah 1,6-1,9 mg/dL untuk orang dewasa. Sedangkan saat kromogen non-kreatinin dihilangkan, nilai rentang kreatinin menjadi sekitar 1,2-1,4 mg/dL. Kadar kreatinin pada Wanita lebih rendah 0,1-0,2 mg/dL. (Hendromartono, 2009).

#### **2.4.2 Metode Kinetik**

Pada pemeriksaan kreatinin dengan metode ini relatif sama hanya dalam proses pembacaan dibutuhkan sekali pembacaan yang tepat. Alat yang digunakan dalam metode kinetik adalah autoanalyzer (Winarni, 2010).

### 2.4.3 Metode Enzimatik

Pada pengukuran ini memiliki substrat sebagai dasar dari metode. Dengan menggunakan alat *photometer*, substrat yang terdapat pada sampel akan bereaksi dengan enzim dan membentuk suatu senyawa substrat. Enzim yang digunakan yaitu enzim kreatinin amidohidrolase (Winarni, 2010). Reaksi yang terjadi dalam metode enzimatik ditunjukkan pada **Gambar 2.3**. Enzim kreatinin amidohidrolase mengubah kreatinin menjadi kreatin. Kreatin dipecah menjadi sarkosin dan urea oleh kreatin amidinohidrolase. *Sarcosine* oksidase dan peroksidase menghasilkan warna kromogen yang dibaca pada 540 nm (ABX Pentra Enzymatic Creatinine CP). Pengukuran kreatinin secara enzimatik ini tidak mendeteksi kromogen lain selain kreatinin sehingga hasil yang ditunjukkan lebih rendah daripada metode Jaffe (Hendromartono, 2009). Nilai rujukan untuk pemeriksaan serum kreatinin metode enzimatik dengan menggunakan alat Pentra C200 yaitu, 0,62-1,10 mg/dL untuk laki-laki dan 0,45-0,75 mg/dL untuk perempuan (ABX Pentra Enzymatic Creatinine). Metode enzimatik memiliki spesifitas sangat tinggi sehingga hasil pemeriksaan serum kreatinin menggunakan metode enzimatik menjadi gold standard dalam pemeriksaan serum kreatinin. Keunggulan utama metode enzimatik adalah akurasi yang cukup tinggi (Winarni, 2010).



**Gambar 2. 3** Reaksi Enzimatik Serum Kreatinin



## 2.5 Streptozotosin (STZ)

*Streptozotocin* (STZ, 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose) merupakan senyawa kimia yang disintesis dari *Streptomyces achromogenes* dan digunakan untuk menginduksi baik diabetes mellitus tipe 1 maupun tipe 2. Streptozotocin memasuki sel  $\beta$  melalui transporter glukosa (GLUT 2) dan menyebabkan alkilasi DNA. Kerusakan DNA menginduksi aktivasi poly ADP-ribosylation, yang menyebabkan deplesi NAD<sup>+</sup> dan ATP seluler. Peningkatan defosforilasi ATP setelah induksi streptozotosin menghasilkan substrat bagi reaksi katalisis xantin oksidase yang menghasilkan radikal superoksida. Akibatnya hidrogen peroksida dan radikal hidroksil juga terbentuk. Selanjutnya, streptozotocin membebaskan banyak zat toksik dari nitric oksid yang menghambat aktivitas aconitase dan berperan pada kerusakan DNA, yang pada akhirnya terjadi apoptosis dan nekrosis sel  $\beta$  (Szkuldeski, 2001).

Efek diabetogenik pada pemberian streptozotosin *multiple* dengan dosis rendah (40 mg/kgbb selama 5 hari berturut-turut) diinisiasi oleh *reactive oxygen species* (ROS) melalui efek toksik langsung pada GLUT 2, kerja sitokin TNF- $\alpha$  dan INF- $\gamma$  akibat stimulasi sel T *dependent*, serta aktivasi NF- $\kappa$ B. Sebagai respon terhadap streptozotocin, *Th-1 type cytokines* dan sel-sel imun lainnya menghasilkan ROS yang mengaktifkan NF- $\kappa$ B, berikutnya menyebabkan aktivasi gen yang terkait sitokin-sitokin pro inflamasi yang diaktifkan dan mengaktifkan NF- $\kappa$ B. Regulasi ini menjadikan respon inflamasi lokal diperkuat dan dipertahankan. Aktivitas anti inflamasi berkurang, dan berakhir dengan kerusakan sel  $\beta$  pankreas (Lgssiar *et al*, 2004).

Derajat kerusakan sel  $\beta$  pankreas pada hewan coba diabetes bergantung pada dosis streptozotosin yang digunakan. Injeksi streptozotosin dosis tinggi 60 mg/kgbb *intraperitoneal* terbukti menyebabkan kerusakan sel  $\beta$  pankreas dan kondisi diabetes yang persisten. Pemberian dosis tunggal memicu kerusakan langsung pada sel  $\beta$  pankreas yang diakibatkan oleh terjadinya alkilasi DNA yang ekstensif, menyebabkan terjadinya nekrosis sel. Kerusakan sel pankreas dan kondisi diabetes yang terjadi secara perlahan dapat dicapai apabila streptozotosin diberikan secara bertahap pada dosis rendah. Kerusakan terjadi melalui kombinasi efek toksik streptozotosin langsung pada sel  $\beta$  pankreas, dan cidera akibat reaksi imunologi (Simon *et al*, 1992).

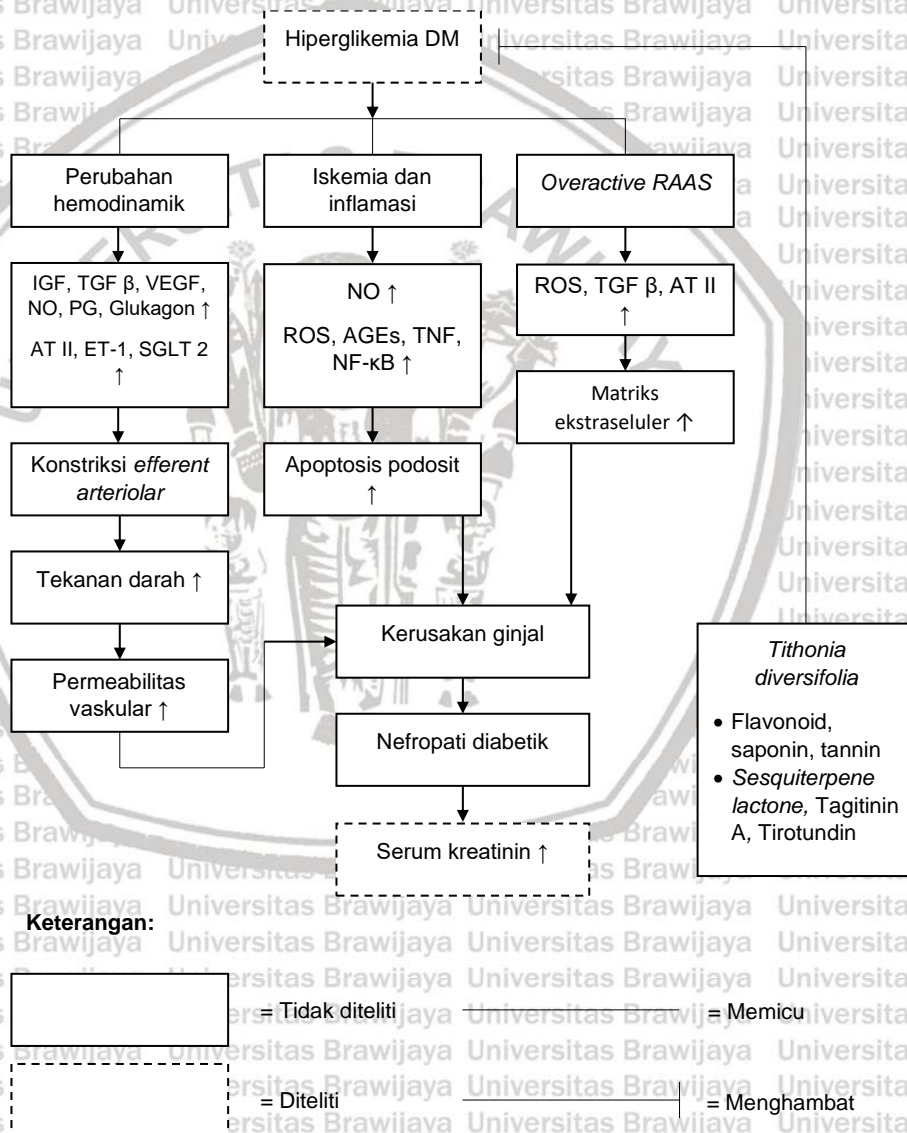




BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Hiperglikemia yang terjadi pada DM memiliki efek jangka panjang salah satunya nefropati diabetik (ND). ND dapat terjadi melalui 3 mekanisme yaitu perubahan hemodinamik ginjal, iskemia dan abnormalitas metabolisme glukosa yang menyebabkan peningkatan dari stres oksidatif, proses inflamasi, dan peningkatan aktivitas *renin angiotensin aldosterone system* (RAAS). Perubahan hemodinamik ginjal menyebabkan pelepasan mediator vasoaktif (TGF  $\beta$ , VEGF, NO, PG, dan glucagon) sehingga terjadi dilatasi afferent arteriolar. Pada saat yang sama hiperglikemia menyebabkan konstiksi *efferent arteriolar* akibat peningkatan angiotensin II (AT II). Endotelin (ET 1) mengakibatkan vasokonstriksi dan disfungsi pembuluh darah, dapat menyebabkan kerusakan podosit, stress oksidatif, dan inflamasi. Inflamasi dan RAAS menyebabkan meningkatkan *reactive oxygen species* (ROS) yang mengakibatkan kerusakan podosit glomerulus dan meningkatkan apoptosis podosit glomerulus. ROS menstimulasi TGF  $\beta$  melalui pembentukan *advanced glycation end-product* (AGEs). ROS yang berikatan dengan reseptor AGEs akan memicu factor-factor transkripsi seperti NF $\kappa$ B yang memicu peningkatan sitokin.

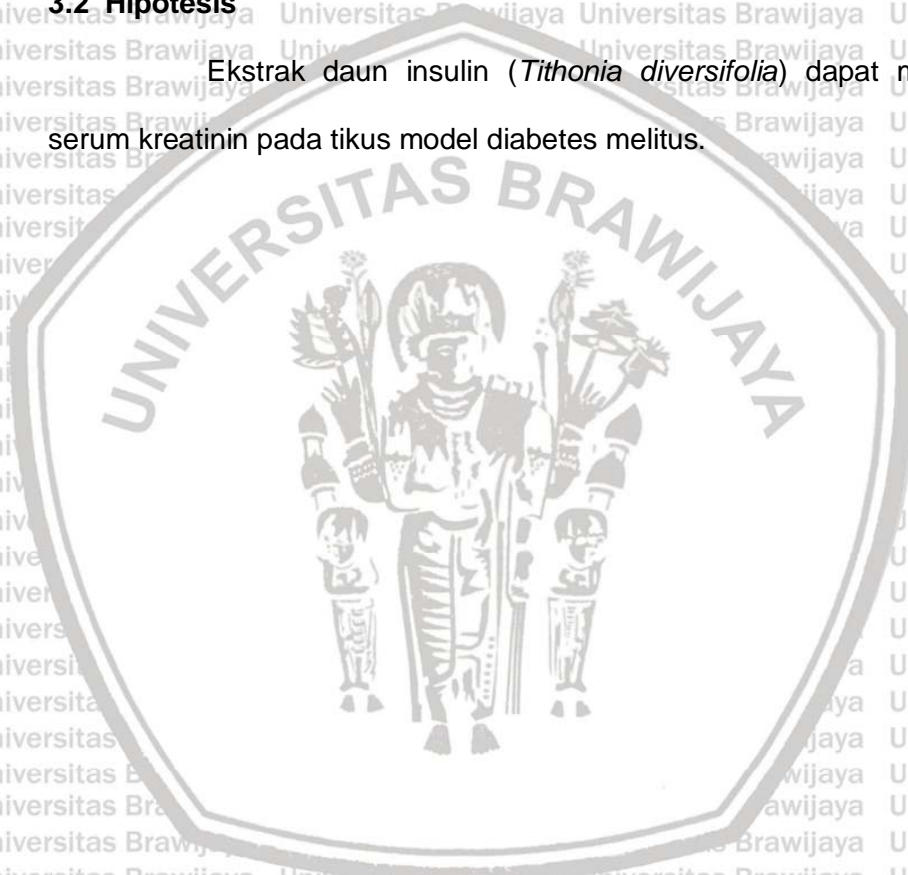
*Tithonia diversifolia* (flavonoid dan terpenoid) berperan sebagai antioksidan yang dapat menurunkan stres oksidatif yang disebabkan oleh diabetes. Selain itu, *Tithonia diversifolia* (seskuiterpen lakton, tirotundin dan tagitinin A) dapat meningkatkan aktivitas *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPARs) sehingga meningkatkan sensitivitas insulin dan menurunkan kadar glukosa darah dan memperbaiki keadaan hiperglikemia sehingga dapat



mencegah peningkatan kadar serum kreatinin dan menurunkan resiko kerusakan ginjal akibat diabetes.

### 3.2 Hipotesis

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dapat menurunkan kadar serum kreatinin pada tikus model diabetes melitus.



## BAB 4

## METODOLOGI PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan *true experimental design*. Penelitian ini menggunakan rancangan *Post Test Only Control Group Design* dan menggunakan hewan coba tikus galur Wistar (*Rattus novvergicus*) jantan. Sampel dipilih secara random. Terdapat kelompok kontrol dan kelompok yang diberikan perlakuan.

## 4.2 Populasi dan Sampel

## 4.2.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah model tikus putih (*Rattus novvergicus*) galur Wistar jantan berusia 6-8 minggu dengan berat 160-200 gram. Sampel penelitian dipilih secara acak dengan metode simple random sampling. Perhitungan jumlah sampel dilakukan menggunakan rumus Federer. Adapun rumus Federer yaitu:  $(t-1)(r-1) > 15$ , di mana  $t$  adalah jumlah kelompok percobaan dan  $r$  merupakan jumlah sampel tiap kelompok (Supranto, 2000). Penelitian ini akan menggunakan 6 kelompok perlakuan, sehingga perhitungan sampel menjadi:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$5(r-1) \geq 15$$

$$5r-5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$



$$r \geq 4$$

Hasil penghitungan dengan rumus di atas didapatkan  $r \geq 4$  sehingga jumlah sampel tiap perlakuan lebih dari sama dengan 4 ekor tikus wistar. Replikasi dilakukan untuk menghindari kemungkinan hewan coba mati ( $f$ ) = 25% selama penelitian maka besar replikasi dikalikan  $1/(1 - f)$ , sehingga  $1/(1 - 0,25) \times 4 = 5,33 \approx 6$ .

Jadi, dalam penelitian ini jumlah sampel keseluruhan yang digunakan adalah 36 ekor tikus wistar dalam 6 kelompok.

#### Kriteria inklusi:

- Jenis tikus (*Rattus novergicus*) galur wistar
- Berat badan tikus  $\pm 160 - 200$  gram
- Usia tikus 6-8 minggu
- Jenis kelamin tikus jantan
- Tikus dalam keadaan sehat, yang ditandai dengan tikus bergerak aktif

#### Kriteria eksklusi:

- Tikus memiliki kelainan anatomi (cacat fisik)

### 4.2.2 Kelompok Penelitian

Kelompok penelitian terdiri dari 36 ekor tikus yang dibagi secara acak (KN, KP, P1, P2, P3, dan P4) dengan ketentuan seperti yang tertera pada **Tabel 4.1**.

**Tabel 4. 1** Kelompok, Jumlah, dan Perlakuan Sampel Penelitian

Kelompok	Jumlah	Perlakuan
Kontrol negatif (KN)	6	Tidak diberikan perlakuan
Kontrol positif (KP)	6	STZ dalam buffer sitrat (i.p) <sup>a</sup>

Perlakuan 1 (P1)	6	STZ dalam buffer sitrat (i.p) <sup>a</sup> + ETD 50 mg/kgBB (p.o) <sup>b</sup>
Perlakuan 2 (P2)	6	STZ dalam buffer sitrat (i.p) <sup>a</sup> + ETD 100 mg/kgBB (p.o) <sup>c</sup>
Perlakuan 3 (P3)	6	STZ dalam buffer sitrat (i.p) <sup>a</sup> + ETD 150 mg/kgBB (p.o) <sup>d</sup>
Perlakuan 4 (P4)	6	STZ dalam buffer sitrat (i.p) <sup>a</sup> + glikuidon (p.o) <sup>e</sup>

Keterangan:

a: 40 mg/kgBB STZ dalam buffer sitrat 50 Mm pH 4,5 1 mL/kgBB injeksi *intraperitoneal* (i.p)

b: 50 mg/kgBB ekstrak *Tithonia diversifolia* dalam CMC Na, pemberian *per oral* (p.o)

c: 100 mg/kgBB ekstrak *Tithonia diversifolia* dalam CMC Na, pemberian *per oral* (p.o)

d: 150 mg/kgBB ekstrak *Tithonia diversifolia* dalam CMC Na, pemberian *per oral* (p.o)

e: 10 mg/kgBB glikuidon dalam CMC Na, pemberian *per oral* (p.o)

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang diberikan pada tiap kelompok perlakuan.

#### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar serum kreatinin pada tikus model diabetes.

#### 4.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah:

- Jenis tikus (*Rattus novergicus*) galur wistar
- Berat badan tikus 160 – 200 gram



- Usia tikus 6-8 minggu
- Jenis kelamin tikus jantan
- Pemeliharaan tikus dengan pakan dan minum ad libitum
- Dosis pemberian streptozotosin 40 mg/KgBB

#### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi Departemen Farmasi Bahan Alam, Laboratorium Hewan (Animal House) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya, dan Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Penelitian dilakukan mulai dari Juli sampai Desember 2020.

#### 4.5 Alat dan Bahan

##### 4.5.1 Preparasi Ekstrak

Bahan yang digunakan untuk preparasi ekstrak: simplisia daun insulin (*Tithonia diversifolia*), etanol 70%, CMC Na, aquadest, kertas saring, handscoon dan masker.

Alat yang digunakan untuk preparasi ekstrak: toples kaca, overhead stirrer, timbangan analitik, corong buchner, beaker glass, gelas ukur, batang pengaduk, oven, rotary evaporator, cawan porselen, sendok kayu, dan pipet tetes.

#### 4.5.2 Persiapan Hewan Coba

Bahan yang digunakan untuk persiapan hewan coba: tikus wistar (*Rattus novergicus*), pakan tikus DB-1 dan tepung, sekam, air mineral, hand scoon, dan masker.

Alat yang digunakan untuk persiapan hewan coba: Kandang tikus, wadah makanan, botol minum, timbangan analitik, dan timbangan tikus.

#### 4.5.3 Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus

Bahan yang digunakan untuk pembuatan tikus model diabetes melitus: tikus wistar (*Rattus novergicus*), streptozotosin (STZ), buffer sitrat 0,01 M pH 4,5; asam sitrat, natrium sitrat; *water for injection* (WFI), handscoon dan masker.

Alat yang digunakan untuk pembuatan tikus model diabetes melitus: spuit/syringe, gelas ukur, beaker glass, batang pengaduk, kaca arloji, dan pipet tetes.

#### 4.5.4 Pemberian Terapi

Bahan yang digunakan untuk pemberian terapi: glikuidon, ekstrak daun insulin, CMC Na.

Alat yang digunakan untuk pemberian terapi: spuit/syringe, sonde, gelas ukur, gelas beaker, batang pengaduk, kaca arloji, dan pipet tetes.

#### 4.5.5 Pengukuran Serum Kreatinin

Bahan yang digunakan untuk pengukuran parameter: sampel serum, reagen ABX Pentra Enzymatic Creatinine CP, alkohol 70%, kapas, handscoon, dan masker.

Alat yang digunakan untuk pengukuran serum kreatinin: Microtube, micropipet, vacutainer dan analyzer ABX PENTRA C200.



#### 4.6 Definisi Operasional

##### 1. Tikus Diabetes Melitus

Tikus diabetes melitus adalah tikus yang telah diinduksi streptozotisin (STZ) dan memiliki kadar glukosa darah  $> 200$  mg/dL setelah 72 jam diinduksi STZ 40 mg/kgBB. Darah tikus diambil melalui ekor dan kadar glukosa darah diukur menggunakan alat glukometer. Kadar glukosa darah setelah diberi perlakuan diukur pada hari ke-0, 7, 14, 21, 28, 35, dan 42.

##### 2. Kreatinin

Kreatinin merupakan hasil metabolisme endogen dari otot skeletal yang diekskresikan melalui filtrasi glomerulus yang akan dibuang melalui urine dan tidak direabsorpsi atau disekresikan oleh tubulus ginjal. Tinggi rendahnya kadar kreatinin dalam darah digunakan sebagai indikator penting dalam menentukan apakah seorang mengalami gangguan fungsi ginjal. Pemeriksaan serum kreatinin dilakukan dengan mengirim sampel serum ke Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

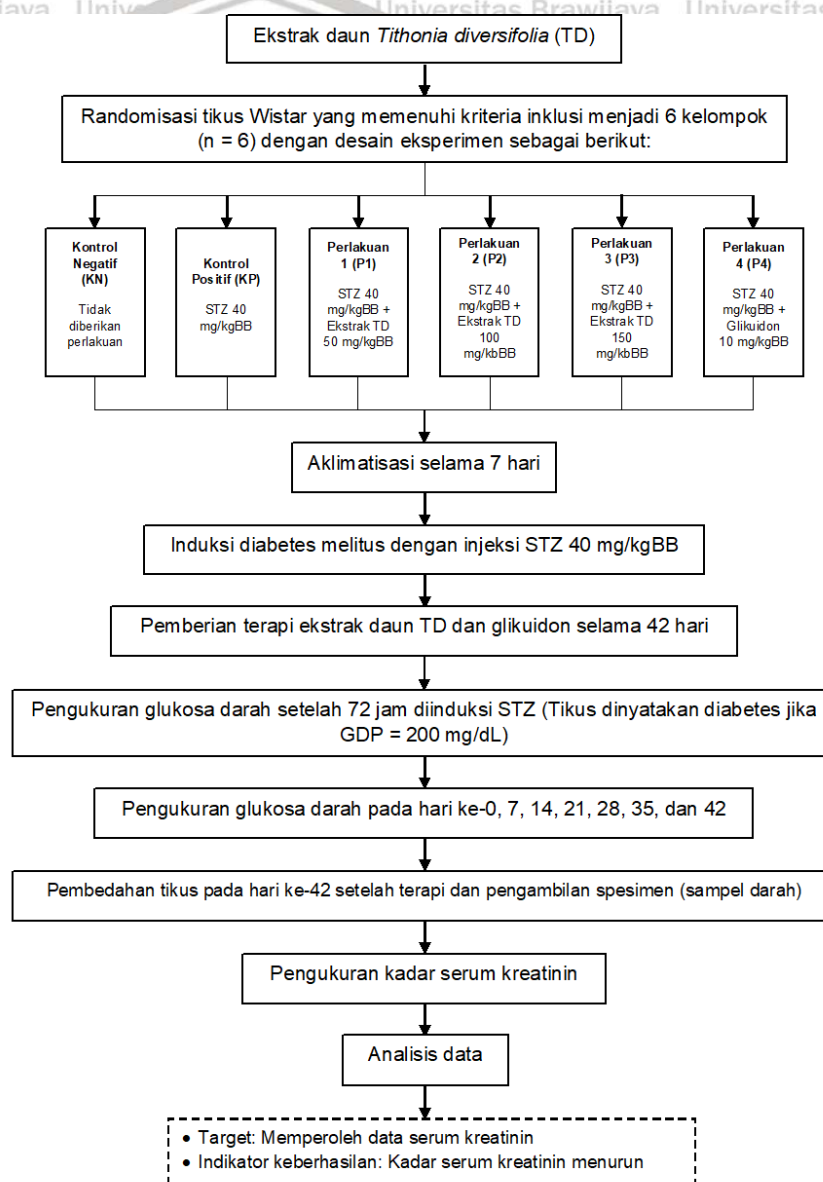
##### 3. Ekstrak Daun Insulin

Ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dalam penelitian ini adalah filtrat ekstrak daun insulin yang didapatkan melalui proses maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Simplisia daun insulin (*Tithonia diversifolia*) didapatkan dari Balai Materia Medika (BMM). Hasil determinasi terlampir pada **Lampiran**

2. Dosis ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50, 100, dan 150 mg/kgBB tikus. Ekstrak daun insulin

(*Tithonia diversifolia*) dilarutkan dalam larutan CMC Na 1% dan diberikan secara oral.

#### 4.7 Alur Penelitian



Gambar 4. 1 Alur Penelitian



#### 4.8 Prosedur Penelitian

##### 4.8.1 Preparasi Ekstrak

Daun insulin (*Tithonia diversifolia*) diekstraksi menggunakan metode maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia daun dimaserasi dengan 5 L etanol 70% dalam toples kaca (A) selama 72 jam. Langkah-langkah preparasi ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) adalah sebagai berikut:

1. Simplisia daun insulin ditimbang sebanyak 500 g dengan timbangan analitik
2. Etanol 70% diukur sebanyak 2 L dengan gelas ukur 1 L
3. 500 g simplisia dilarutkan dalam 2 L etanol 70% dalam toples kaca (A)
4. (3) diaduk dengan *overhead stirer* dengan kecepatan 200 – 300 rpm selama 30 menit
5. Campuran didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang
6. Campuran disaring menggunakan corong buchner
7. Filtrat ditampung, didapatkan filtrat 1
8. Residu dari maserasi pertama ditambahkan dengan 1,5 L etanol 70%
9. (8) Diaduk dengan *overhead stirer* dengan kecepatan 200 – 300 rpm selama 30 menit
10. Campuran didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang
11. Campuran disaring menggunakan corong buchner
12. Filtrat ditampung, didapatkan filtrat 2
13. Residu dari maserasi kedua ditambahkan dengan 1,5 L etanol 70%
14. (13) diaduk dengan *overhead stirer* dengan kecepatan 200 – 300 rpm selama 30 menit

15. Campuran didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang
16. Campuran disaring menggunakan corong buchner
17. Filtrat ditampung, didapatkan filtrat 3
18. Filtrat 1, 2 dan 3 dicampur dan dimasukkan ke dalam jerigen
19. Cawan porselen ditimbang untuk penampungan ekstrak kental
20. Campuran filtrat 1, 2, dan 3 dimasukkan ke labu alas bulat pada rotary evaporator dengan suhu 40°C
21. Ekstrak kental dipindahkan ke cawan porselen
22. Ekstrak pada cawan porselen dipanaskan menggunakan oven pada suhu 40°C
23. Ekstrak ditimbang *ad berat konstan* (perubahan bobot tidak melebihi 0.25% (FI V))
24. Dihitung % rendemen dengan rumus:

$$\% \text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Bobot rendemen ekstrak yang didapat}}{\text{Bobot simplisia yang ditimbang}} \times 100\%$$

Ekstrak daun insulin kemudian dilarutkan dalam larutan CMC Na 1%.

Dosis ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) yang digunakan pada penelitian ini adalah 50, 100, 150 mg/kgBB. Rincian perhitungan ekstrak dapat diamati pada

### Lampiran 3.

#### 4.8.2 Persiapan Hewan Coba

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah model tikus putih (*Rattus novvergicus*) galur Wistar jantan berusia 6-8 minggu dengan berat 160-200 gram. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian adalah 6 ekor tikus setiap



kelompok. Terdapat 6 kelompok perlakuan dalam penelitian ini, sehingga jumlah total tikus yang digunakan adalah 36 ekor tikus.

1. Saat pertama kali tikus datang, tikus ditimbang bobotnya menggunakan timbangan analitik.
2. Tikus dimasukkan ke dalam kandang yang sudah diberi label (1 kandang berisi 1 tikus). Kandang tikus terbuat dari bak plastic berukuran berukuran 30 cm x 40 cm x 15 cm dan disediakan botol air, wadah pakan, sekam serta tutup bak dari kawat dan kayu.
3. Tikus diaklimatisasi selama 7 hari. Tikus diberi makan berupa campuran DB-1 dan tepung serta minum air.
4. Kandang tikus dibersihkan tiap 2 hari sekali dan botol minum dibersihkan setiap minggu agar tidak ada lumut yang menempel. Kebutuhan makan dan minum tikus harus dijaga selama masa adaptasi.
5. Tikus ditimbang setiap minggu.

#### 4.8.3 Pembuatan Tikus Model Diabetes Melitus

##### A. Preparasi Larutan Buffer Sitrat

1. Natrium sitrat dan asam sitrat ditimbang masing-masing sebanyak
2. Natrium sitrat dan asam sitrat masing-masing dilarutkan dalam WFI di beaker glass
3. Masing-masing dipindahkan ke dalam labu ukur 25 mL dan di ad sampai tanda batas
4. Larutan natrium sitrat diambil 11 mL dan larutan asam sitrat diambil 14 mL, dimasukkan ke dalam beaker glass dan diaduk

5. pH larutan dicek menggunakan pH meter (jika belum sesuai dapat ditambahkan NaOH atau HCl hingga pH mencapai 4,5)
6. Jika pH sudah sesuai, larutan dipindahkan ke labu ukur 50 mL dan di ad sampai batas tanda
7. Rincian preparasi larutan buffer sitrat dapat diamati pada **Lampiran 4**.

#### B. Induksi Streptozotosin

1. STZ dosis 40 mg/kgBB ditimbang dan dimasukkan ke dalam falcon yang sudah dilapisi aluminium foil
2. Larutan buffer sitrat dimasukkan ke falcon dengan menggunakan membran filter 0,2  $\mu$ m dan spuit
3. Larutan buffer sitrat dan STZ divortex hingga homogen
4. Larutan STZ diberikan pada tikus melalui intraperitoneal menggunakan syringe
5. Rincian pemberian induksi STZ dapat diamati pada **Lampiran 5**.

#### 4.8.4 Pemberian Terapi

1. CMC Na ditimbang 50 mg dan dimasukkan ke dalam beaker glass berisi aquadest hangat kemudian diaduk menggunakan batang pengaduk
2. Larutan CMC Na dipindahkan ke labu ukur 50 mL dan di ad dengan aquadest hingga batas tanda
3. Ekstrak daun insulin 50, 100, 150 mg/kgBB dan glikuidon 10 mg/kgBB dilarutkan dalam larutan CMC Na 1%
4. Terapi (ekstrak daun insulin dan glikuidon) diberikan pada kelompok perlakuan sesuai dengan ketentuan.



5. Terapi diberikan setiap hari menggunakan sonde selama 42 hari.

#### 4.8.5 Pengambilan Sampel dan Pengukuran Serum Kreatinin

##### A. Pengambilan Sampel

1. Tikus dimasukkan ke dalam chamber CO<sub>2</sub> untuk dilakukan proses euthanasia
2. Tikus yang sudah tidak sadar dilakukan pembedahan menggunakan alat bedah
3. Darah tikus diambil melalui jantung menggunakan syringe dan dimasukkan ke dalam vacutainer merah
4. Organ tubuh tikus yang tidak dimanfaatkan dikubur
5. Darah yang sudah ditampung pada vacutainer merah dilakukan proses sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10-20 menit hingga mendapatkan serum
6. Serum diambil menggunakan mikropipet dan ditampung di microtube dan disimpan pada suhu dingin

##### B. Pengukuran Serum Kreatinin

1. Pengukuran kadar serum kreatinin dilakukan mengirimkan sampel serum ke Lab Patologi Klinik FKUB
2. Pemeriksaan serum kreatinin menggunakan metode enzimatik dengan alat *analyzer* ABX PENTRA C200
3. Volume sampel yang dibutuhkan yaitu 5,6  $\mu$ L/uji

4. Terdapat 2 reagen yang digunakan. 1 kit reagen terdiri dari 22 mL Reagen 1 dan 8 mL Reagen 2. Komposisi dari reagen yang digunakan dapat diamati pada **Tabel 4.2**.

**Tabel 4. 2** Komposisi Reagen

Reagen 1		Reagen 2	
Buffer pH 7,5 pada 25°C		Buffer pH 7,5 pada 25°C	
Creatine amidinohydrolase (microbial)	>12000 U/L	Creatinine amidohydrolase (microbial)	>135000 U/L
Sarcosine oxidase (microbial)	>4000 U/L	4-aminoantipyrine	>1,5 mmol/L
N-ethyl-N-sulfoethyl-m-toluidine	>0,24 mmol/L	Peroxidase (botanical)	>2000 U/L
Ascorbate oxidase (botanical)		Stabilizer	
Stabilizer		Surfactant	
Surfactant		Sodium azide	7,7 mol
Preservative			

5. Sampel akan secara otomatis dilakukan pengukuran dan intensitas warna yang akan terbentuk akan dibaca pada panjang gelombang 545 nm sehingga dapat diketahui kadar serum kreatinin pada setiap sampel.

#### 4.9 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan software IBM SPSS Statistics 26 dengan tingkat kebermaknaan 0,05 ( $p=0,05$ ). Analisa data dimulai dengan uji normalitas *Saphiro-wilk* karena data kurang dari 50 dan uji homogenitas. Uji normalitas dilakukan untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ )



dan uji homogenitas untuk mengetahui apakah data terdistribusi homogen ( $p > 0,05$ ).

Jika data terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) maka dilanjutkan menggunakan uji parametrik

*One-way Analysis of Variance* (ANOVA) untuk melihat apakah data berbeda secara

signifikan atau bermakna ( $p < 0,05$ ). Jika data memiliki perbedaan signifikan

dilanjutkan uji *Post Hoc Turkey* menggunakan *Least Significance Differences* (LSD)

untuk mengetahui perbandingan *mean* kelompok satu dengan kelompok lainnya dan

mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan. Namun, jika data

penelitian tidak berdistribusi normal ( $p < 0,05$ ) dan tidak homogen, maka dilakukan

alternatif yaitu dengan uji non parametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis* yang

kemudian dilanjutkan dengan Uji *Mann Whitney*.

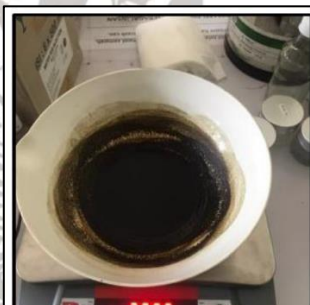


## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Ekstraksi

Daun insulin (*Tithonia diversifolia*) diekstraksi melalui proses maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Hasil ekstraksi dari daun insulin memiliki bentuk yang kental, berwarna hijau kecoklatan, rasa yang pahit, dan berbau seperti daun teh hijau. Ekstrak kental yang dihasilkan dapat diamati pada **Gambar 5.1** dan jumlah ekstrak kental yang diperoleh dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.



**Gambar 5. 1** Hasil Ekstraksi Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*)

**Tabel 5. 1** Hasil Ekstraksi Daun Insulin

	Bobot Simplisia (g)	Bobot Ekstrak (g)	%Rendemen
Ekstraksi 1	285,714	34,5	12,075
Ekstraksi 2	500	51,5	10,3
Jumlah	785,714	86	22,375
Rata-rata		43	11,1875

#### 5.2 Hasil Pengukuran Kadar Serum Kreatinin

Pada penelitian ini sampel penelitian terbagi menjadi 6 kelompok dengan menggunakan teknik *simple random sampling* dan masing-masing kelompok terdiri



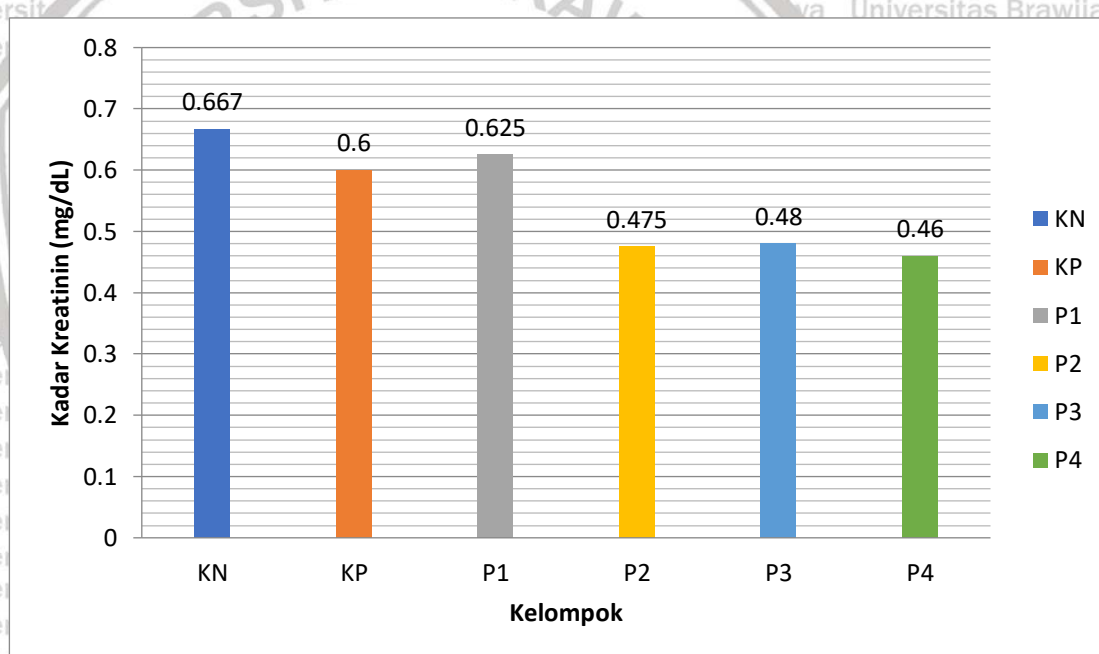
dari 6 ekor tikus. Hewan coba terbagi menjadi 6 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (KN) yang tidak diberi perlakuan, kelompok kontrol positif (KP) diberikan STZ 40 mg/kgBB, kelompok perlakuan 1 (P1) diberikan STZ 40 mg/kgBB dan ekstrak daun insulin dosis 50 mg/kgBB, kelompok perlakuan 2 (P2) diberikan STZ 40 mg/kgBB dan ekstrak daun insulin dosis 100 mg/kgBB, kelompok perlakuan 3 (P3) diberikan STZ 40 mg/kgBB dan ekstrak daun insulin dosis 150 mg/kgBB, dan kelompok perlakuan 4 (P4) diberikan STZ 40 mg/kgBB dan glikuidon dosis 10 mg/kgBB.

Kadar serum kreatinin tikus pada penelitian ini adalah kadar serum kreatinin yang diukur pada hari ke-42 setelah perlakuan. Sampel serum yang telah diperoleh dari hasil sentrifugasi dikirimkan ke Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pengukuran kadar serum kreatinin dilakukan menggunakan metode enzimatik dengan enzim kreatinin amidohidrolase yang mengubah kreatinin menjadi kreatin. Hasil pengukuran kadar serum kreatinin dapat diamati pada **Tabel 5.2**.

**Tabel 5. 2 Rata-Rata Kadar Serum Kreatinin Setelah H42 Terapi**

Kelompok	Hewan Uji	Kadar Serum Kreatinin	Rata-rata (mg/dL $\pm$ SD)
KN	1	0,7	0,667 $\pm$ 0,0211
	2	0,6	
	3	0,7	
	4	0,6	
	5	0,7	
	6	0,7	
KP	1	0,6	0,600 $\pm$ 0,0000
	2	0,6	
	4	0,6	
	5t	0,6	
	1t	0,6	
P1	2	0,7	0,625 $\pm$ 0,0250
	3	0,6	
	6	0,6	
P2	1t	0,5	0,475 $\pm$ 0,0211
	2	0,5	

P3	3t	0,5	0,480 ± 0,0374
	4	0,4	
	1	0,5	
	2	0,4	
	4	0,4	
	5t	0,6	
P4	6	0,5	0,460 ± 0,0245
	1	0,4	
	2	0,4	
	4	0,5	
	5t	0,5	
	6	0,5	



Gambar 5. 2 Grafik Rata-Rata Kadar Serum Kreatinin

### 5.3 Analisis Data

Data hasil penelitian yang diperoleh dilakukan analisis statistik menggunakan software IBM SPSS Statistics 26 dengan tingkat kebermaknaan yang digunakan adalah 0,05 ( $p = 0,05$ ). Hasil analisa statistik pengukuran kadar serum



kreatinin dapat diamati pada **Lampiran 7**. Berdasarkan hasil uji normalitas didapatkan kadar serum kreatinin tidak terdistribusi normal ( $p < 0,05$ ) sehingga tidak dapat dilakukan uji parametrik *One Way ANOVA*.

**Tabel 5. 3** Hasil Analisa Data Kadar Serum Kreatinin

	KN	KP	P1	P2	P3	P4
KN	-	0,127	0,495	0,017*	0,036*	0,018*
KP	0,127	-	0,317	0,011 <sup>#</sup>	0,046 <sup>#</sup>	0,013 <sup>#</sup>
P1	0,495	0,317	-	0,015 <sup>^</sup>	0,044 <sup>^</sup>	0,017 <sup>^</sup>
P2	0,017*	0,036*	0,018*	-	0,874	0,495
P3	0,011 <sup>#</sup>	0,046 <sup>#</sup>	0,013 <sup>#</sup>	0,874	-	0,752
P4	0,018 <sup>^</sup>	0,013 <sup>^</sup>	0,017 <sup>^</sup>	0,495	0,874	-

Keterangan

(\*) menunjukkan perbedaan yang signifikan jika dibandingkan KN ( $p < 0,05$ )

(<sup>#</sup>) menunjukkan perbedaan yang signifikan jika dibandingkan KP ( $p < 0,05$ )

(<sup>^</sup>) menunjukkan perbedaan yang signifikan jika dibandingkan P1 ( $p < 0,05$ )

**Tabel 5.2** menunjukkan rata-rata hasil kadar serum kreatinin setelah 42

hari pemberian terapi. Kelompok KN memiliki rata-rata kadar serum kreatinin yang paling tinggi yaitu  $0,667 \pm 0,0211$ , diikuti dengan P1 ( $0,625 \pm 0,0250$ ); KP ( $0,600 \pm 0,0000$ ); P3 ( $0,480 \pm 0,0374$ ); P2 ( $0,475 \pm 0,0211$ ); dan P4 ( $0,460 \pm 0,0245$ ). Data dari

hasil pengukuran kadar serum kreatinin dilakukan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Uji normalitas yang digunakan adalah *Shapiro-Wilk* karena jumlah

sampel  $< 50$  sampel. Berdasarkan uji normalitas tersebut didapatkan kelompok KN ( $p = 0,024$ ); KP ( $p = 0,000$ ); P1 ( $p = 0,001$ ); P2 ( $p = 0,001$ ); P3 ( $p = 0,272$ ); dan P4 ( $p = 0,024$ ). Hasil uji normalitas memiliki tujuan untuk mengetahui persebaran data

penelitian, persebaran data dikatakan normal apabila nilai signifikansi  $p > 0,05$ .

(Dahlan, 2014). Oleh sebab indikator tersebut dapat disimpulkan bahwa data kelompok KN, KP, P1, P2, dan P4 memiliki persebaran yang tidak normal atau data

tidak berdistribusi dengan normal. Selain uji normalitas, dilakukan juga uji

homogenitas. Data dikatakan berdistribusi homogen apabila nilai signifikansi  $p > 0,05$ .

Dari hasil uji homogenitas didapatkan data memiliki nilai homogenitas  $p = 0,005$ . Oleh sebab indikator tersebut dapat disimpulkan bahwa data tidak berdistribusi homogen.

Hasil analisis data kadar serum kreatinin menggunakan SPSS dapat diamati pada **Lampiran 7**. Dari hasil uji normalitas terdapat data yang tidak berdistribusi normal, maka tidak dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA, sehingga dilakukan alternatif uji non-parametrik menggunakan uji *Kruskal-Wallis*. Hasil dari uji *Kruskal-Wallis* didapatkan data memiliki nilai signifikansi  $p = 0,004$ . Data dikatakan memiliki perbedaan yang signifikan apabila memiliki nilai signifikansi  $p < 0,05$ . Oleh karena indikator tersebut dapat disimpulkan terdapat perbedaan rata-rata yang bermakna antar kelompok. Uji Kruskal Wallis kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Hasil uji *Mann-Whitney* dapat dilihat pada **Tabel 5.3**. Perbedaan signifikan ( $p < 0,05$ ) diperoleh antara kelompok KN-P2 ( $p = 0,017$ ); KN-P3 ( $p = 0,036$ ); KN-P4 ( $p = 0,018$ ); KP-P2 ( $p = 0,011$ ); KP-P3 ( $p = 0,046$ ); KP-P4 ( $p = 0,013$ ); P1-P2 ( $p = 0,015$ ); P1-P3 ( $p = 0,044$ ); dan P1-P4 ( $p = 0,017$ ). Sementara itu, tidak ditemukan perbedaan signifikan ( $p > 0,05$ ) antara kelompok KN dengan kelompok KP dan P1, serta antara kelompok P2 dengan kelompok P3 dan P4.



## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Pada penelitian ini, daun insulin (*Tithonia diversifolia*) diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Ekstraksi dilakukan sebanyak 2 kali.

Ekstraksi pertama menggunakan 285,714 g simplisia daun insulin. Dari ekstraksi pertama didapatkan bobot ekstrak 34,5 g dan rendemen 12,075%. Ekstraksi kedua menggunakan 500 g simplisia daun insulin. Dari ekstraksi kedua didapat bobot ekstrak 51,5 g dan rendemen 10,3%. Total rendemen yang didapatkan dari 2 kali ekstraksi adalah 22,375% dengan rata-rata 11,1875%. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Triyasmono dan Suhartono (2015), ekstraksi daun insulin dilakukan dengan cara soxhletasi melalui 2 tahap. Tahap pertama dengan menimbang 50 g serbuk daun kembang bulan dan diekstraksi dengan pelarut n-heksana. Ekstrak n-heksana diambil dan residu dikeringkan, kemudian residu diekstraksi tahap kedua menggunakan etanol 96%. Hasil ekstraksi yang diperoleh adalah sebesar 52,25 g dengan %rendemen sebesar 8,17 %. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi hasil rendemen, antara lain konsentrasi pelarut, jenis pelarut, metode ekstraksi, variasi pelarut, temperatur, dan durasi ekstraksi (Perry dan Hilton, 1973).

Streptozotsin (STZ) merupakan zat penginduksi diabetes yang menyebabkan kerusakan DNA sehingga terjadi peningkatan aktivitas poli (ADP-ribosa) polimerasi (PARP-1) dan mengakibatkan reduksi NAD<sup>+</sup> dan ATP sehingga terjadi kerusakan pada  $\beta$  pankreas dan apoptosis. STZ memiliki waktu paruh yang

panjang sehigga lebih stabil dalam menyebabkan hiperglikemia dan kerusakannya spesifik pada sel  $\beta$  pankreas (Novrial, 2007). Dosis STZ yang digunakan pada penelitian ini adalah 40 mg/kgBB. Rata-rata kadar serum kreatinin kelompok yang diinduksi STZ saja (KP) adalah  $0,600 \pm 0,0000$  mg/dL. Namun, rata-rata kadar serum kreatinin kelompok yang tidak diberi perlakuan (KN) lebih tinggi daripada KP meskipun tidak signifikan ( $p > 0,05$ ) yaitu  $0,667 \pm 0,0211$  mg/dL. Hal tersebut dapat terjadi karena ginjal belum mengalami kerusakan secara signifikan. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa 48 jam pertama setelah induksi DM dengan STZ mulai terjadi peningkatan ekskresi NO urin, peningkatan produksi NO menyebabkan kondisi hiperfiltrasi dan hipertrofi pada tahap awal kerusakan ginjal. Produksi NO akan dimulai pada minggu pertama setelah induksi dan mengalami peningkatan secara signifikan pada minggu ke 2 sampai 8 setelah induksi STZ (Levin-laina *et al.*, 2011). Pemberian STZ dengan dosis 35-65 mg/kgBB secara intraperitoneal akan menyebabkan kondisi DM yang stabil (Mostafavinia *et al.*, 2016). Dosis tersebut awalnya akan menimbulkan hiperglikemia akan tetapi mekanisme perbaikan segera teraktivasi dengan cara mengurangi atau menghentikan glikosuria (Firdaus *et al.*, 2016). Beberapa penelitian lain yang menggunakan STZ sebagai agen diabetogenik dapat diamati pada **Tabel 6.1.**

**Tabel 6. 1** Hasil penelitian rata-rata kadar serum kreatinin pada kelompok kontrol normal dan kelompok diabetik yang diinduksi streptozotosin dengan berbagai dosis

Dosis STZ	Lama Perlakuan	Hasil	Referensi
35 mg/kgBB	4 minggu	Rata-rata kadar serum kreatinin: • Kelompok kontrol normal = $0,48 \pm 0,19$ mg/dL.	(Jain dan Saha, 2017).



		<ul style="list-style-type: none"> <li>Kelompok kontrol diabetik = <math>1,31 \pm 0,11</math> mg/dL.</li> </ul>	
40 mg/kgBB	4 minggu	Rata-rata kadar serum kreatinin: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kelompok kontrol normal = <math>0,48 \pm 0,19</math> mg/dL.</li> <li>Kelompok kontrol diabetik = <math>1,31 \pm 0,11</math> mg/dL.</li> </ul>	(Tandi <i>et al.</i> , 2019).
40 mg/kgBB	12 minggu	Rata-rata kadar serum kreatinin: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kelompok kontrol normal = <math>74,40 \pm 10,22</math> <math>\mu</math>mol/L <math>\approx 0,84 \pm 0,12</math> mg/dL.</li> <li>Kelompok kontrol diabetik = <math>96,69 \pm 10,99</math> mg/dL <math>\approx 1,09 \pm 0,12</math> mg/dL.</li> </ul>	(Qi <i>et al.</i> , 2011).
40 mg/kgBB	8 minggu	Rata-rata kadar serum kreatinin: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kelompok kontrol normal = <math>0,5</math> mg/dL.</li> <li>Kelompok kontrol diabetik = <math>1,7</math> mg/dL.</li> </ul>	(Qi <i>et al.</i> , 2021).
40 mg/kgBB	2 minggu	Rata-rata kadar serum kreatinin: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kelompok kontrol normal = <math>0,29 \pm 0,01</math> mg/dL.</li> <li>Kelompok kontrol diabetik = <math>0,53 \pm 0,05</math> mg/dL.</li> </ul>	(Kundu <i>et al.</i> , 2011).
55 mg/kgBB	4 minggu	Rata-rata kadar serum kreatinin: <ul style="list-style-type: none"> <li>Kelompok kontrol normal = <math>0,4072 \pm 0,0994</math>.</li> <li>Kelompok kontrol diabetik = <math>2,322 \pm 0,2338</math>.</li> </ul>	(Yuniashi, 2016).

Keterangan:

Faktor konversi ( $\mu$ mol/L  $\rightarrow$  mg/dL):  $\mu$ mol/L  $\times 0,0113$  = mg/dL.

Kreatinin merupakan hasil metabolisme endogen dari otot skeletal yang diekskresikan melalui filtrasi glomerulus yang akan dibuang melalui urine dan tidak direabsorpsi atau disekresikan oleh tubulus ginjal. Tinggi rendahnya kadar kreatinin dalam darah dapat digunakan sebagai salah satu indikator dalam menentukan apakah seseorang mengalami gangguan fungsi ginjal. Kadar kreatinin normal pada manusia

adalah 0,8 sampai 1,4 mg/dL, secara umum kadar kreatinin pada wanita lebih rendah yaitu sekitar 0,6 sampai 1,2 mg/dL. Perbedaan tingkat kadar kreatinin pada wanita dan laki-laki tersebut disebabkan oleh massa otot yang lebih sedikit pada wanita (Dabla, 2010). Hasil pemeriksaan serum kreatinin biasanya digunakan untuk menghitung laju filtrasi glomerulus atau *Glomerulus Filtration Rate* (GFR) (Handayani dan Dharmawan, 2009). Kadar kreatinin berada dalam keadaan relatif konstan, sehingga menjadikannya sebagai penanda filtrasi ginjal yang baik. Kadar kreatinin yang dipergunakan dalam persamaan perhitungan memberikan pengukuran fungsi ginjal yang lebih baik, karena dengan mengetahui kadar serum kreatinin didapatkan pengukuran klirens kreatinin sehingga memberikan informasi mengenai GFR. Kreatinin merupakan zat yang ideal untuk mengukur fungsi ginjal karena merupakan produk hasil metabolisme tubuh yang diproduksi secara konstan, difiltrasi oleh ginjal, tidak direabsorpsi, dan disekresikan oleh tubulus proksimal. Sekitar 10% kreatinin urin disekresikan oleh tubulus (Verdiansyah, 2016).

Nilai normal serum kreatinin untuk tikus galur wistar jantan adalah 0,20-0,80 mg/dL (Laksmi, N.L.G.M.C *et al.*, 2014). Pada **Tabel 5.2** menunjukkan rata-rata kadar serum kreatinin kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun insulin 100 mg/kgBB (P2) dan 150 mg/kgBB (P3), serta glikuidon 10 mg/kgBB (P4) memiliki perbedaan lebih rendah yang signifikan ( $p < 0,05$ ) dengan kelompok yang tidak diberi perlakuan (KN), kelompok yang diinduksi STZ saja (KP), dan kelompok perlakuan ekstrak daun insulin 50 mg/kgBB (P1). Namun, rata-rata kadar serum kreatinin semua kelompok masih termasuk dalam rentang normal. Hal ini menunjukkan kerusakan



ginjal masih pada tahap awal sehingga belum terjadi peningkatan kadar serum kreatinin di atas rentang normal (Alfarisi *et al.*, 2013).

Nefropati diabetik (ND) memiliki tahapan atau stadium penyakit yang terdiri dari tahap I sampai dengan tahap V. Tahap I ND sudah terjadi hiperfiltrasi dan hipertrofi tetapi kadar serum kreatinin masih normal. Tahap I pada ND juga belum mengalami albuminuria. Tahap II ND disebut juga sebagai *silent stage* karena pada tahapan ini terjadi lesi glomerular tanpa gejala klinis, tahap ini ditandai dengan penebalan membran basal dan proliferasi mesangial, tetapi kadar serum kreatinin masih normal. Tahap III merupakan tahap mikroalbuminuria dan sudah mulai terjadi peningkatan kadar serum kreatinin. Tahap IV yaitu tahap gagal ginjal kronis dengan kondisi makroalbuminuria dan peningkatan kadar serum kreatinin yang signifikan. Tahap terakhir adalah tahap V atau *end stage renal disease* (ESRD) (Pasau, 2014). Serum kreatinin dan *Blood Urea Nitrogen* (BUN) bukan merupakan indikator yang baik untuk kerusakan ginjal pada tahap awal (Nisa, 2021). Peningkatan kreatinin baru terlihat jika kerusakan ginjal sudah memasuki tahap III (pertengahan). Hiperfiltrasi merupakan mekanisme awal patogenik dalam kerusakan ginjal. Ginjal yang mengalami pengurangan fungsi akan melakukan kompensasi dengan cara meningkatkan filtrasi glomerulus yang sehat sehingga kondisi hiperfiltrasi dan hipertrofi pada tahap I dan II ND belum menyebabkan peningkatan kadar serum kreatinin pada hewan coba (Alfarisi *et al.*, 2013).

Pada penelitian ini, meskipun kelompok yang diberi perlakuan ekstrak daun insulin memiliki rata-rata kadar serum kreatinin lebih rendah daripada kelompok kontrol namun rata-rata kadar serum kreatinin pada semua kelompok masih termasuk



dalam rentang normal. Seperti pada penelitian yang dilakukan Indrasari (2020) menguji efektivitas daun insulin (*Tithonia diversifolia*) terhadap tikus model diabetes melitus yang diinduksi STZ 50 mg/kgBB. Penelitian dilakukan selama seminggu. Sampel penelitian terbagi menjadi 5 kelompok dan masing-masing kelompok berisikan 4 ekor tikus dengan pembagian kelompok hewan coba yaitu kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan), kelompok kontrol positif (metformin 40 mg/kgBB), kelompok perlakuan 1 (ekstrak etanol daun insulin dosis 50 mg/kgBB), kelompok perlakuan 2 (ekstrak etanol daun insulin 250 mg/kgBB), dan kelompok perlakuan 3 (ekstrak etanol daun insulin 500 mg/kgBB). Tahapan penelitian dibagi menjadi 3, yaitu aklimatisasi (7 hari), penginduksian DM (3 hari), dan intervensi (7 hari). Hasil penelitian yang dilakukan Indrasari (2020) menunjukkan kelompok yang diberi ekstrak daun insulin dosis 50 dan 500 mg/kgBB (P1 dan P3) memiliki perbedaan lebih rendah yang signifikan terhadap kelompok kontrol normal (KN) dan kelompok yang diberikan metformin 40 mg/kgBB (KP). Namun, rata-rata kadar kreatinin semua kelompok masih termasuk dalam rentang normal. Hal tersebut dapat terjadi karena ginjal belum mengalami kerusakan secara signifikan sehingga kadar serum kreatinin belum mengalami peningkatan (Indrasari, 2020).

Penelitian yang dilakukan oleh Khoerul Anwar pada tahun 2016 menyatakan bahwa ekstrak etanol daun kembang bulan memiliki kandungan kimia berupa alkaloid, saponin, flavonoid dan tanin. Kandungan kimia yang dimiliki ekstrak etanol daun kembang bulan menimbulkan efek antidiabetes atau antihiperглиkemia. Alkaloid memiliki fungsi untuk melepaskan insulin dari sel  $\beta$  pankreas dan efek perlindungan pada sel  $\beta$  pankreas akibat induksi DM pada hewan coba. Saponin



berfungsi sebagai antioksidan yang dapat melindungi sel  $\beta$  pankreas dan memberikan efek pengurangan degranulasi, saponin juga memiliki mekanisme kerja yang mirip dengan penghambat  $\alpha$  glukosidase. Flavonoid membantu proses regenerasi sel  $\beta$  pankreas dengan cara menangkal radikal bebas, meningkatkan pelepasan insulin dan menstimulasi penyerapan kalsium atau  $\text{Ca}^{2+}$ . Tanin merupakan antioksidan yang dapat menginduksi fosforilasi reseptor insulin dengan membentuk GLUT 4 (Anwar, 2017).

## 6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian

Pada penelitian ini dapat diamati pemberian ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dengan dosis 100 dan 150 mg/kgBB menunjukkan perbedaan lebih rendah yang signifikan terhadap kelompok kontrol. Namun, baik pada kelompok kontrol maupun perlakuan memiliki rata-rata kadar serum kreatinin yang masih termasuk ke dalam rentang normal. Oleh karena itu belum dapat ditentukan apakah ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) efektif dalam menurunkan kadar serum kreatinin, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan dosis ekstrak yang efektif untuk menurunkan kadar serum kreatinin sebagai pencegahan kerusakan ginjal akibat DM.

## 6.3 Keterbatasan Penelitian

Dalam penelitian ini, tidak dilakukan konfirmasi secara klinis untuk mengetahui hewan coba mengalami diabetik nefropati atau tidak, sehingga tidak

dapat diketahui apakah kerusakan ginjal pada hewan coba masih pada tahap awal

atau sudah signifikan.





## BAB 7

## PENUTUP

### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan di atas, dapat disimpulkan bahwa kelompok yang diberikan perlakuan terapi ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dosis 100 dan 150 mg/kgBB menunjukkan perbedaan lebih rendah yang signifikan terhadap kelompok kontrol normal, kelompok yang diberikan STZ saja, dan kelompok terapi ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) dosis 50 mg/kgBB. Namun, kadar serum kreatinin pada semua kelompok masih termasuk dalam rentang normal sehingga belum dapat ditentukan apakah ekstrak daun insulin (*Tithonia diversifolia*) efektif dalam menurunkan kadar serum kreatinin.

### 7.2 Saran

1. Serum kreatinin bukan merupakan indikator kerusakan ginjal pada tahap awal, sehingga diperlukan indikator lain yang dapat menjadi indikator kerusakan ginjal tahap awal seperti albumin.
2. Konfirmasi secara klinis perlu dilakukan untuk mengetahui tingkat dari kerusakan ginjal pada hewan coba, apakah masih pada tahap awal atau sudah parah.



## DAFTAR PUSTAKA

- Ajie, R.B. White dragon fruit (*Hylocereus undatus*) potential as Diabetes Mellitus treatment. *Jurnal Majority*, 2015, 4 (1).
- Alfarisi, S., Basuki, W. and Susantiningsih, T. Perbedaan kadar kreatinin serum pasien diabetes melitus tipe 2 yang terkontrol dengan yang tidak terkontrol di RSUD Dr. H. Abdul Moeloek Bandar Lampung Tahun 2012. *Jurnal Majority*, 2013, 2(5).
- Alfonso, A.A., Mongan, A.E. and Memah, M.F. Gambaran kadar kreatinin serum pada pasien penyakit ginjal kronik stadium 5 non dialisis. *eBiomedik*, 2016, 4(1).
- Amanatie, A. and Sulistyowati, E. Structure elucidation of the leaf of *Tithonia diversifolia* (Hemsl) Gray. *Jurnal Sains dan Matematika Universitas Diponegoro*, 2015, 23 (4): 101-106.
- American Diabetes Association. 2016. Approaches to glycemic treatment. Sec. 7. In *Standards of Medical Care in Diabetes*. *Diabetes Care* 2016;39 (Suppl. 1): S52–S59.
- Anwar, K., Hariadi, R.E.P., Kamalia, N., Santoso, H.B. and Ngindra, A.P.L. Perbandingan Efek Ekstrak Etanol, Fraksi N-Butanol, dan Fraksi Petroleum Eter Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray) Terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah Mencit Jantan Yang Diinduksi Aloksan. *Jurnal Pharmascience*, 2017, 3(2).
- Baek J, Son Y, Choi K, Park Y, Lee J. Depression, Symptoms, and The Quality of Life in Patients on Hemodialysis for End Stage Renal Disease. *American Journal Nephrology*. 2003, 29(1): 36-42
- Bjornstad, P., Cherney, D.Z. and Maahs, D.M. Update on estimation of kidney function in diabetic kidney disease. *Current diabetes reports*, 2015, 15 (9): 57.
- Blasiak J., et al. Free Radical Scavengers Can Modulate the DNA-Damaging Action of Alloxan. *Acta Biocem*, 2003, 50 (1): 205-10.
- Chagas-Paula, D.A., Oliveira, R.B., da Silva, V.C., Gobbo-Neto, L., Gasparoto, T.H., Campanelli, A.P., Faccioli, L.H., Da Costa, F.B. Chlorogenic Acids from *Tithonia diversifolia* Demonstrate Better Anti-Inflammatory Effect than Indomethacin and Its Sesquiterpene Lactones. *J Ethnopharmacol*, 2011, 136, 355–362
- Chawla, A., Chawla, R. and Jaggi, S., 2016. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: distinct or continuum?. *Indian journal of endocrinology and metabolism*, 2016, 20 (4): 546.
- Dabla, P.K. Renal function in diabetic nephropathy. *World journal of diabetes*, 2010, 1 (2): 48.
- Dalimartha, S. 2005. *Ramuan Tradisional Untuk Pengobatan Diabetes Mellitus*. Bogor: Penerbit Penebar Swadaya.



- Dipiro, J.T., Dipiro, C.V., Schwinghammer, T.L., Wells, B.G. 2015. *Pharmacotherapy Handbook 9th Edition*. New York: McGraw-Hill.
- Di Giacomo, C., Vanella, L., Sorrenti, V., Santangelo, R., Barbagallo, I., Calabrese, G., Genovese, C., Mastrojeni, S., Ragusa, S. and Acquaviva, R. Effects of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray extract on adipocyte differentiation of human mesenchymal stem cells. *Plos one*, 2015, 10 (4): 0122320.
- Ejelonu, O.C., Elekofehinti, O.O., Adanlawo, I.G. *Tithonia diversifolia* saponin-blood lipid interaction and its influence on immune system of normal wistar rats. *Biomed Pharmacother*, 2017, 87, 589–595.
- Fauziyah, Y., Sunarti, Hanoum, I.F., Wahyuningsih, M.S.H. Ethanol Extract of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A Gray Standardized Ameliorates Hyperglycemia, Polyphagia, and Weight Loss in Diabetic Rats. *Molekul*, 2018, 13 (1): 72-79.
- Firdaus, F., Rimbawan, R., Marliyati, S.A. and Roosita, K. Model tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin-sukrosa untuk pendekatan penelitian diabetes melitus gestasional. *Media Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 2016, 12(1): 29-34.
- Geethaa, Saghal, Ramanathan, S., et al. Brine Shrimp Lethality and Acute Oral Toxicity Studies on *Swietenia Mahagoni* (Linn) Jacq. Seed Methanolic Extract. *Pharmacognosy Research*, 2010; 2 (4): 215-220.
- Handajani, N.S. dan Dharmawan, R. 2009. Pengaruh VCO Terhadap Hitung Jenis Leukosit, Kadar Glukosa dan Kreatinin Darah *Mus musculus* Balb/c Hiperglikemi dan Tersensitisasi Ovalbumin
- Hendromartono. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Edisi V*. Jakarta: FKUI.
- Henry, J.B. 2001. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 20th edition. Philadelphia: WB Saunders Company.
- Indrasari, S. 2020. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) Terhadap Kadar Serum Kreatinin pada Tikus Galur Wistar yang Diinduksi Diabetes Melitus dengan Streptozotocin. Tugas Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta. 2020.
- Isniaty, D. Pengaruh Pemberian Aspirin Berbagai Dosis Per Oral Terhadap Kadar Ureum Dan Kreatinin Serum Tikus Wistar. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang, 2007 (Doctoral Dissertation, Faculty of Medicine).
- Jain D. and Saha S. Antioxidant and Antihyperglycaemic Effects of Naringenin Arrest the Progression of Diabetic Nephropathy in Diabetic Rats', *Egyptian Pharmaceutical Journal*, 2017, 16: 144-151.
- Kumar, R., Nandhini, L.P., Kamalanathan, S., Sahoo, J., Vivekanadan, M., 2016. Evidence for current diagnostic criteria of diabetes mellitus. *World J. Diabetes*, 2016 7, 396–405.



Kundu, A., Dey, P., Sarkar, P., Karmakar, S., Tae, I. H., Kim, K. S., Park, J. H., Lee, S. H., Lee, B. M., Renthlei, L., Puia, Z., & Kim, H. S. Protective Effects of Croton hookeri on Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 135, 110873.

Laksmi, N.L.G.M.C., Dada, I.K.A. and Damriyasa, I.M. Bioaktivitas Ekstrak Daun Tapakdara (*Catharanthus roseus*) terhadap Kadar Kreatinin dan Kadar Ureum Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus*). *Buletin Veteriner Udayana*, 2014, 6(2): 2085-2495.

Lee, J.S. Albumin for End-Stage Liver Disease. *Korean J. Intern Med*, 2017, 27 13–19.

Levey, A.S., Coresh, J., Balk, E., Kausz, A., Levin, A., Steffes, M.W. National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. *Ann Intern Med*, 2003.

Levin-Iaina, N., Iaina, A. and Raz, I. The emerging role of NO and IGF-1 in early renal hypertrophy in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2011, 27(3): 235-243.

Lgssiar A, Hassan M, Schott-Ohly P, Friesen N, Nicoletti F, Trepicchio WL. Interleukin-11 inhibits NFκB and AP-1 activation in islets and prevents diabetes induced with streptozotocin in mice. *Exp Biol Med*, 2004, 229: 425-36.

Li, X., Chuang, P.Y., D'Agati, V.D., Dai, Y., Yacoub, R., Fu, J., Xu, J., Taku, O., Premrurit, P.K., Holzman, L.B., He, J.C. Nephron Preserves Podocyte Viability and Glomerular Structure and Function in Adult Kidneys. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2015 1–17.

Lim Andy K.H. Diabetic nephropathy – complications and treatment. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, 2014, (7):361-381.

Lin, Y.C., Chang, Y.H., Yang, S.Y., Wu, K.D. and Chu, T.S. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2018, 117 (8): 662-675.

Mihardja, L., Soetrisno, U., Soegondo, S. Prevalence and clinical profile of diabetes mellitus in productive aged urban Indonesians. *J. Diabetes Investig*, 2014, 5, 507–512.

Miranda, M.A., Varela, R.M., Torres, A., Molinillo, J.M., Gualtieri, S.C. and Macias, F.A., 2015. Phytotoxins from *Tithonia diversifolia*. *Journal of natural products*, 2015, 78 (5): 1083-1092.

Mostafavinia, A., Amini, A., Ghorishi, S.K., Pouriran, R. and Bayat, M. The effects of dosage and the routes of administrations of streptozotocin and alloxan on induction rate of type1 diabetes mellitus and mortality rate in rats. *Laboratory animal research*, 2016, 32(3): 160-165.



- Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R.R., Sherwin, R. and Zinman, B. Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. *Diabetologia*, 2009 52 (1): 17.
- Neal, M.J. 2012. *Medical Pharmacology at a Glance 7th Edition*. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd.
- Nisa, Lailita F. Efektivitas Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) Terhadap Kadar Blood Nitrogen Urea (BUN) pada Tikus Model Diabetes Melitus. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, 2021.
- Novrial, D. Kerusakan Sel  $\beta$  Pankreas Akibat Induksi Streptozotocin: Tinjauan Patologi Eksperimental. *Mandala of Health*, 2007, 3 (2).
- Putri, R.I. Faktor Determinan Nefropati Diabetik pada penderita Diabetes Mellitus di RSUD Dr. M. Soewandhie Surabaya. *Jurnal Berkala Epidemiologi*, 2015, 3 (10): 109-121.
- Qi, M. Y., Chen, K., Liu, H. R., Su, Y. H., & Yu S. Q. Protective effect of Icariin on the early stage of experimental diabetic nephropathy induced by streptozotocin via modulating transforming growth factor  $\beta$ 1 and type IV collagen expression in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, (138): 731– 736.
- Qi, S. S., Shao, M. L., Ze, S., & Zheng, H. X. Salidroside from *Rhodiola rosea* L. Attenuates Diabetic Nephropathy in STZ induced Diabetic Rats Via Anti-Oxidative Stress, Anti-inflammation, and Inhibiting TGF- $\beta$ 1/Smad Pathway. *Journal of Functional Foods*, 2021, 77, 104329.
- Remer, T., Neubert, A., Maser-Gluth, C. Anthropometry-based reference values for 24-h urinary creatinine excretion during growth and their use in endocrine and nutritional research. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002.
- Sasmita, F.W., Susetyarini, E., Husamah, H. and Pantiwati, Y. Efek Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) terhadap Kadar Glukosa Darah Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Alloxan. *Majalah Ilmiah Biologi BIOSFERA: A Scientific Journal*, 2017, 34 (1): 22-31.
- Simon OR, West ME. Unstable diabetic state produced by a small dose of streptozotocin in rats. *West Indian Med J*, 1992, 41: 146-49.
- Stevens, L.A. dan Levey, A.S. Clinical Implications for Estimating Equations for Glomerular Filtration Rate, *Ann. Intern. Med*, 2004, 141: 959-961.
- Szkuldeski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 2001, 50: 536-46.
- Tandi, J., Lalu, R., Nuraisyah, S., Magfirah., Kenta, YS., & Nobertson, R. Uji Potensi Nefropati Diabetes Daun Sirih Merah (*Piper croatum Ruiz & Pav*) pada Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*). *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 2020, 6(3): 239-251.



Thomas, M.C., Brownlee, M., Susztak, K., Sharma, K., Jandeleit-Dahm, K.A., Zoungas, S., Rossing, P., Groop, P.H. and Cooper, M.E. Diabetic kidney disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 2015, 1 (1): pp.1-20.

Triyasmono L. dan Suhartono E. Daya Larut Ekstrak Etanol Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) Terhadap Batu Ginjal Kalsium Secara In Vitro. *Jurnal Pharmascience*, 2015, 2 (1): 26-34.

Vallon, V. and Thomson, S.C. Renal function in diabetic disease models: the tubular system in the pathophysiology of the diabetic kidney. *Annual review of physiology*, 2012, 74 351-375.

Verdiansyah. Pemeriksaan Fungsi Ginjal. *CDK*, 2016, 43 (2): 148-152.

Winarni, K. 2010. *Perbedaan Hasil Pemeriksaan Kreatinin Metode Jaffe Reaction Antara Cara Deproteinasi dan Tanpa Deproteinasi*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan Universitas Muhammadiyah Semarang, Semarang. 2010.

Yuniasih, Ni N. Efektivitas Ekstrak Metanol Alga Cokelat Terhadap Kadar Malondialdehid dan Kreatinin Serum sebagai Prevensi Gangguan Fungsi Ginjal. Skripsi. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Jember. 2016.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1 Keterangan Kelaihan Etik



KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS KEDOKTERAN

Jalan Veteran Malang – 65145, Jawa Timur - Indonesia  
Telp. (0341) 551611 Pes. 213.214; 569117, 567192 – Fax. (62) (0341) 564755  
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : sekr.fk@ub.ac.id

**KETERANGAN KELAikan ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 126 / EC / KEPK / 06 / 2020

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

**JUDUL** : Efektivitas Ekstrak Daun Insulin (*Tithonia diversifolia*) terhadap Penurunan Nefropati Diabetik pada Tikus Model Diabetes Melitus

**PENELITI UTAMA** : Oktavia Rahayu Adianingsih, S.Farm., M.Biomed., Apt.

**ANGGOTA** : Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm, Apt.

Firda Khoirunnisa  
Lailita Fahrin Nisa  
Mutia Khairunnisa Sya'bani  
Nabila Rifdati Fawwazia  
Weliyatul Auli Sasmita

**UNIT / LEMBAGA** : Fakultas Kedokteran - Universitas Brawijaya Malang.

**TEMPAT PENELITIAN** : Laboratorium Percobaan Hewan Coba dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Laboratorium Sentral Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang.

**DINYATAKAN LAIK ETIK.**



Prof. Dr. dr. Moch. Istiadid ES, SpS, SpBS(K), SH, M.Hum, Dr(Hk)  
NIPK. 20180246051611001

**Catatan :**

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan Pada Akhir Penelitian, Laporan Hasil Penelitian Wajib Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk Hard Copy. Jika Ada Perubahan Protokol Dan / Atau Perpanjangan Penelitian, Harus Mengajukan Kembali Permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

## Lampiran 2 Surat Determinasi Tanaman Paitan



**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR**  
**DINAS KESEHATAN**  
**UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU**  
 Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396  
**KOTA BATU 65313**

Nomor : 074/338A/102.7/2020  
 Sifat : Biasa  
 Perihal : Determinasi Tanaman Paitan

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : OKTAVIA RAHAYU ADIANINGSIH, S.Farm., M.Biomed., Apt.  
 NIK : 2016099210192001  
 Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN, UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman paitan

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)  
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)  
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)  
 Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)  
 Sub Kelas : Asteridae  
 Ordo : Asterales  
 Famili : Asteraceae  
 Genus : *Tithonia*  
 Spesies : *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) Gray  
 Nama umum : Daun insulin, paitan, rondosemoyo, kembang bulan, kayu paik, kipait, harsaga.

Kunci determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15a-109b-119b-120a-121a-122a.  
 2. Morfologi : Habitus: semak, dengan tinggi mencapai 2-3 m. Batang: berkayu. Daun: bulat telur menjari, bergerigi, kasar, panjang 10 sampai 40 cm, agak berkelenjar, dan bagian bawah keabu-abuan. Bunga: majemuk, berwarna kuning, lebar 5-15 cm dan panjang  $\pm 10$  cm, memiliki bunga bentuk pita dan tabung. Biji: benih achenes, kecil, kering, atau pecah dengan dinding tipis, 4-siku, dan panjang  $\pm 5$  mm.

3. Bagian yang digunakan : Daun.  
 4. Penggunaan : Penelitian.

5. Daftar Pustaka

- Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Van Steenis, C.G.G.J. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 30 April 2020

Kepala UPT Laboratorium Herbal  
 Materia Medica Batu,





### Lampiran 3 Preparasi Terapi (Ekstrak dan Glikuidon)

1. Dosis ekstrak daun insulin (bobot tikus = 200 gram)

- a. P1 = 50 mg/kg BB  $\rightarrow$  10mg/200gBB
- b. P2 = 100 mg/kg BB  $\rightarrow$  20 mg/200gBB
- c. P3 = 150 mg/kg BB  $\rightarrow$  30 mg/200gBB

2. Kebutuhan total ekstrak

- a. P1 = 10 mg/200 g BB x 6 tikus x 42 hari = 2.520 mg  $\rightarrow$  60 mg/hari
- b. P2 = 20 mg/200 g BB x 6 tikus x 42 hari = 5.040 mg  $\rightarrow$  120 mg/hari
- c. P3 = 30 mg/200 g BB x 6 tikus x 42 hari = 7.560 mg  $\rightarrow$  180 mg/hari
- d. Total = (2.520 + 5.040 + 7.560) mg = 15.120 mg  $\rightarrow$  15,120 g

3. Kebutuhan gliquidone jika bobot tikus 200 g

$$P4 = 10 \text{ mg/kgBB} \times 200 \text{ gBB} = 2 \text{ mg/200gBB}$$

$$\text{Total kebutuhan gliquidone} = 2 \text{ mg} \times 6 \text{ tikus} \times 42 \text{ hari} = 504 \text{ mg} \rightarrow 12 \text{ mg/hari}$$

4. Kebutuhan volume pelarut CMCNa

$$\text{Volume lambung tikus} = \pm 3 - 5 \text{ mL}$$

$$\text{Volume larutan yang diinjeksikan tidak boleh lebih dari } 5 \text{ mL/kgBB}$$

$$\text{Jika BB tikus } 200 \text{ gram, } \rightarrow \text{volume maksimal yang boleh} = 1 \text{ mL (1 mL/200 gram)}$$

$$\text{Pemberian} = 5 \text{ ml/kgBB} \rightarrow 1 \text{ ml/200gBB}$$

$$\text{Total kebutuhan pelarut per hari} = 1 \text{ ml} \times 5 \text{ kelompok} \times 6 \text{ tikus} = 30 \text{ ml/hari}$$

Kebutuhan per kelompok

- a. P1 = 60 mg ekstrak/6ml CMCNa
- b. P2 = 120 mg ekstrak/6ml CMCNa
- c. P3 = 180 mg ekstrak/6ml CMCNa
- d. P4 = 12 mg gliquidone/6 ml CMCNa

$$\text{Total kebutuhan larutan CMCNa per hari} = 24 \text{ ml} \approx 50 \text{ ml}$$

$$\text{Pembuatan larutan CMCNa } 1\% = 1 \text{ g/100 ml} = 0,5 \text{ g/50 ml} \rightarrow \text{per tikus diberikan pelarut CMCNa sebanyak } 1 \text{ ml/200 gBB}$$

**Lampiran 4 Pembuatan Buffer Sitrat**

- a. Larutan Asam Sitrat = 2,101 g Asam sitrat dalam 100 mL aquadest (Larutan A)
- b. Larutan Natrium Sitrat = 2,941 g Natrium sitrat dalam 100 mL aquadest (Larutan B)
- c. Volume total larutan buffer sitrat = 28 mL larutan A + 22 mL larutan B ad 50 mL pH 4,5

Untuk melarutkan STZ:

a. Larutan asam sitrat  $= \frac{21,01 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} = \frac{x}{25 \text{ ml}}$ ,  $x = 0,5253 \text{ g}$  dalam 25 ml aquades (Larutan A)

b. Larutan natrium sitrat  $= \frac{29,41 \text{ g}}{1000 \text{ ml}} = \frac{x}{25 \text{ ml}}$ ,  $x = 0,7353 \text{ g}$  dalam 25ml aquades (Larutan B)

Buffer sitrat = 14 ml larutan A + 11 ml larutan B di ad 50 ml hingga pH 4,5

1 tikus diinduksi dengan 40 mg STZ yang dilarutkan dalam 0,2 mL buffer sitrat.



**Lampiran 5 Perhitungan Dosis Streptozotosin (STZ)**

1. Dosis STZ yang digunakan = 40 mg/kgBB dilarutkan dalam buffer sitrat 50mM (pH 4,5) dengan volume 1 ml/kgBB

2. Kebutuhan STZ apabila bobot tikus 200 g

$$\text{Kebutuhan STZ} = \frac{40 \text{ mg}}{1000 \text{ g}} \times 200 \text{ g} \times 5 \text{ kelompok} \times 6 \text{ tikus} = 240 \text{ mg}$$

3. Kebutuhan buffer sitrat 50mM (pH 4,5) 1 ml/kgBB apabila bobot tikus 200 g

$$\text{Kebutuhan buffer sitrat} = \frac{1 \text{ ml}}{1000 \text{ g}} \times 200 \text{ g} \times 5 \text{ kelompok} \times 6 \text{ tikus} = 6 \text{ ml}$$

$$\text{Kebutuhan per tikus} = \frac{6 \text{ ml}}{30 \text{ ekor}} = 0,2 \text{ mL}$$

1 tikus diinduksi dengan 40 mg STZ yang dilarutkan dalam 0,2 mL buffer sitrat.



## Lampiran 6 Hasil Pemeriksaan Serum Kreatinin (Lab Patologi Klinik FKUB)

### HASIL PEMERIKSAAN KIMIA KLINIK FAAL GINJAL : KREATININ

NO	KODE SPESIMEN	JENIS PEMERIKSAAN	HASIL	SATUAN	NILAI RUJUKAN	KETERANGAN
1	SERUM KODE KN1	Kreatinin	0,7	mg/dL		
2	SERUM KODE KN2	Kreatinin	0,6	mg/dL		
3	SERUM KODE KN3	Kreatinin	0,7	mg/dL		
4	SERUM KODE KN4	Kreatinin	0,6	mg/dL		
5	SERUM KODE KN5	Kreatinin	0,7	mg/dL		
6	SERUM KODE KN6	Kreatinin	0,7	mg/dL		
7	SERUM KODE KP1	Kreatinin	0,6	mg/dL		
8	SERUM KODE KP2	Kreatinin	0,6	mg/dL		
9	SERUM KODE KP4	Kreatinin	0,6	mg/dL		
10	SERUM KODE KP5T	Kreatinin	0,6	mg/dL		
11	SERUM KODE P1-T	Kreatinin	0,6	mg/dL		
12	SERUM KODE P1-2	Kreatinin	0,7	mg/dL		
13	SERUM KODE P1-3	Kreatinin	0,6	mg/dL		
14	SERUM KODE P1-6	Kreatinin	0,6	mg/dL		
15	SERUM KODE P2-1T	Kreatinin	0,5	mg/dL		
16	SERUM KODE P2-2	Kreatinin	0,5	mg/dL		
17	SERUM KODE P2-3T	Kreatinin	0,5	mg/dL		
18	SERUM KODE P2-4	Kreatinin	0,4	mg/dL		
19	SERUM KODE P3-1	Kreatinin	0,5	mg/dL		
20	SERUM KODE P3-2	Kreatinin	0,4	mg/dL		
21	SERUM KODE P3-4	Kreatinin	0,4	mg/dL		
22	SERUM KODE P3-5T	Kreatinin	0,6	mg/dL		
23	SERUM KODE P3-6	Kreatinin	0,5	mg/dL		
24	SERUM KODE P4-1	Kreatinin	0,4	mg/dL		
25	SERUM KODE P4-2	Kreatinin	0,4	mg/dL		
26	SERUM KODE P4-4	Kreatinin	0,5	mg/dL		
27	SERUM KODE P4-5T	Kreatinin	0,5	mg/dL		
28	SERUM KODE P4-6	Kreatinin	0,5	mg/dL		



## Lampiran 7 Analisa Data Kadar Serum Kreatinin (SPSS)

### a. Uji Normalitas

Tests of Normality <sup>b</sup>							
	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Kadar Kreatinin	KN	.307	4	.	.729	4	.024
	P1	.441	4	.	.630	4	.001
	P2	.441	4	.	.630	4	.001
	P3	.283	4	.	.863	4	.272
	P4	.307	4	.	.729	4	.024

a. Lilliefors Significance Correction

b. Kadar Kreatinin is constant when Kelompok = KP. It has been omitted.

### b. Uji Homogenitas

#### Test of Homogeneity of Variances

Kadar Kreatinin

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.971	5	18	.005

### c. Uji Kruskal-Wallis

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

	Kadar Kreatinin
Chi-Square	17.480
df	5
Asymp. Sig.	.004

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Kelompok

### d. Uji Mann-Whitney

- Kelompok KN dengan KP

#### Test Statistics<sup>b</sup>

	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

- **Kelompok KN dengan P1**

Test Statistics<sup>b</sup>

	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-.683
Asymp. Sig. (2-tailed)	.495
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

- **Kelompok KN dengan P2**

Test Statistics<sup>b</sup>

	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.397
Asymp. Sig. (2-tailed)	.017
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

- **Kelompok KN dengan P3**

Test Statistics<sup>b</sup>

	Kadar Kreatinin
--	-----------------



Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.097
Asymp. Sig. (2-tailed)	.036
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 <sup>a</sup>

- a. Not corrected for ties.  
b. Grouping Variable: Kelompok

- **Kelompok KN dengan P4**

Test Statistics <sup>b</sup>	
	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

- a. Not corrected for ties.  
b. Grouping Variable: Kelompok

- **Kelompok KP dengan P1**

Test Statistics <sup>b</sup>	
	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 <sup>a</sup>

- a. Not corrected for ties.  
b. Grouping Variable: Kelompok

- **Kelompok KP dengan P2**

Test Statistics <sup>b</sup>	
	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	.000

Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

• **Kelompok KP dengan P3**

Test Statistics <sup>b</sup>	
	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-2.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

• **Kelompok KP dengan P4**

Test Statistics <sup>b</sup>	
	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.494
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

• **Kelompok P1 dengan P2**

Test Statistics <sup>b</sup>	
	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	.000



Wilcoxon W	10.000
Z	-2.428
Asymp. Sig. (2-tailed)	.015
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

- **Kelompok P1 dengan P3**

Test Statistics<sup>b</sup>

	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	11.500
Z	-2.013
Asymp. Sig. (2-tailed)	.044
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

- **Kelompok P1 dengan P4**

Test Statistics<sup>b</sup>

	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.397
Asymp. Sig. (2-tailed)	.017
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

- **Kelompok P2 dengan P3**

Test Statistics<sup>b</sup>

	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	7.500
Wilcoxon W	17.500

Z	-.158
Asymp. Sig. (2-tailed)	.874
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.886 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

- **Kelompok P2 dengan P4**

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-.683
Asymp. Sig. (2-tailed)	.495
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok

- **Kelompok P3 dengan P4**

**Test Statistics<sup>b</sup>**

	Kadar Kreatinin
Mann-Whitney U	7.000
Wilcoxon W	17.000
Z	-.316
Asymp. Sig. (2-tailed)	.752
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.886 <sup>a</sup>

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Kelompok



## Lampiran 8 Dokumentasi Penelitian



Penimbangan Simplicia  
Daun Insulin



Penambahan Etanol  
70%



Pengadukan  
Menggunakan Overhead  
Stirrer



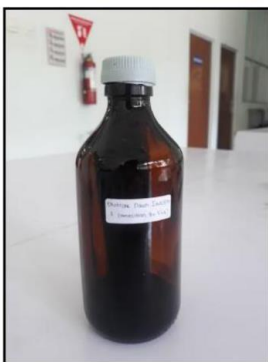
Filtrasi menggunakan  
corong Buchner



Pemekatan filtrat menggunakan rotary  
evaporator



Penimbangan ekstrak  
setelah dioven



Ekstrak disimpan  
dalam botol coklat



Latihan memegang, menyonde,  
dan membedah tikus



Penimbangan bobot tikus



Pembuatan pakan



Pembuatan larutan STZ



Injeksi STZ

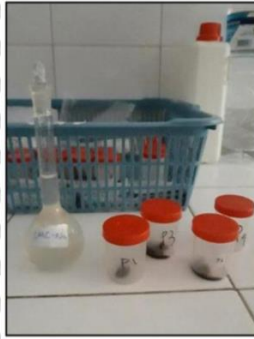


Pengukuran kadar glukosa darah



Penimbangan terapi (ekstrak dan glikuidon)





Preparasi terapi (ekstrak dan glikuidon)



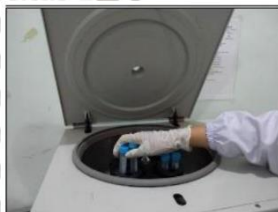
Pemberian terapi menggunakan sonde oleh Analis (Mas Memet)



Euthanasia menggunakan chamber gas CO2



Pembedahan tikus oleh Analis (Mas Memet)



Sentrifugasi sampel darah tikus untuk mendapatkan serum

